

Aus dem Zentrum der Chirurgie
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Klinik für Thorax-, Herz- und thorakale Gefäßchirurgie
Schwerpunkt Thoraxchirurgie und thorakale Transplantation
(Leiter: Prof. Dr. med. Fieguth)

***In vivo Veränderung intramyokardialer Leukocytensubpopulationen nach
Herztransplantation am Rattenmodell. Experimentelle Vergleichsstudie einer
nicht immunsuppressiv behandelten Gruppe versus einer mit Cyclosporin A
behandelten Gruppe***

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs der Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Jens D. Hahner
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2004

**Generationen von Ärzten und wissenschaftlich tätigen Ärzten gewidmet, die uns dorthin
gebracht haben, wo wir heute stehen.**

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	3
2	METHODEN UND STUDIENDESIGN	6
2.1	Versuchstiere, Studiendesign, Dosierungen	7
2.1.1	Das Studiendesign	7
2.1.2	Die Versuchstiere	7
2.1.3	Die Haltung der Versuchstiere	8
2.1.4	Die Medikamentenzubereitung und deren Applikation	8
2.2	Transplantationsmethode, Explantationsmethode, Narkose	9
2.2.1	Das Transplantationsmodell	9
2.2.2	Die Vorbereitung zur Operation und die Narkose	9
2.2.3	Die Explantation des Spenderorgans	10
2.2.4	Die Operation des Empfängertiers	11
2.2.5	Der postoperative Verlauf	14
2.2.6	Die Explantation	15
2.3	Aufarbeitung des Präparats und Durchflußcytometrie	16
2.3.1	Aufarbeitung des Präparats	16
2.3.2	Die verwendeten Antikörper	18
2.3.3	Die durchflußzytometrische Messung (FACS)	24
2.3.4	Die Auswertung der Meßergebnisse	26
2.3.5	Die Statistik	29
3	ERGEBNISSE	31
3.1	Expression von leukozytenspezifischen Antigenen im Herzgewebe transplanterter Ratten ohne Behandlung sowie nach Immunsuppression mit Cyclosporin A	32
3.1.1	Expression von CD 2 Rezeptoren	32
3.1.2	Expression von CD 3 Rezeptoren	33
3.1.3	Expression von CD 4 Rezeptoren	35
3.1.4	Expression von CD 5 Rezeptoren	36
3.1.5	Expression von CD 8 Rezeptoren	38
3.1.6	Expression von CD 11a Rezeptoren	40
3.1.7	Expression von CD 11b Rezeptoren	42
3.1.8	expression von CD 18 Rezeptoren	44
3.1.9	Expression von CD 25 Rezeptoren	46
3.1.10	Expression von CD 45ra Rezeptoren	48
3.1.11	expression von CD 49d rezeptoren	50
3.1.12	Expression von CD 71 Rezeptoren	52
4	DISKUSSION	54
4.1	Zur Wirkung von Cyclosporin A	55
4.1.1	Cyclosporin A ist ein Hemmer der Interleukin 2 Produktion	55

4.2	Zur Rolle von Interleukin-2 bei der Abstoßung transplanterter Organe	57
4.2.1	Interleukin-2 steuert die T-Zell-Antwort bei der Organabstoßung	57
4.3	Zur Expression von leukozytenspezifischen Antigenen im Herzgewebe transplanterter Ratten ohne Behandlung sowie unter Immunsuppression mit Cyclosporin A	58
4.3.1	Expression von CD 2 Rezeptoren	58
4.3.2	Expression von CD 3 Rezeptoren	59
4.3.3	Die Expression von CD 4 Rezeptoren	60
4.3.4	Die Expression von CD 5 Rezeptoren	61
4.3.5	Die Expression von CD 8 Rezeptoren	61
4.3.6	Die Expression von CD 11a Rezeptoren	62
4.3.7	Die Expression von CD 11b Rezeptoren	63
4.3.8	Die Expression von CD 18 Rezeptoren	63
4.3.9	Die Expression von CD 25 Rezeptoren	64
4.3.10	Die Expression von CD 45RA Rezeptoren	65
4.3.11	Die Expression von CD 49d Rezeptoren	66
4.3.12	Die Expression von CD 71 Rezeptoren	68
4.4	Hypothese	68
5	ZUSAMMENFASSUNG	71
6	LITERATURVERZEICHNIS	73

1. EINLEITUNG

Die erste orthotope Herztransplantation [1] wurde im Jahre 1967 durch den südafrikanischen Chirurgen Christian Barnard durchgeführt. Sie eröffnete neue Möglichkeiten in der Therapie der bis dahin kaum zu behandelnden, terminalen Herzinsuffizienz.

Gleichzeitig wurde die medizinische Fachwelt durch diesen Schritt mit Problemen konfrontiert, die bis dato kaum eine Rolle spielten und daher wissenschaftliches Neuland darstellten: Die Abstoßung des fremden Gewebes.

Die akute Abstoßung transplanterter Organe konnte durch eine gezielte Auswahl des Spenderorgans an denjenigen des Empfängers verhindert werden. Außerdem führten verbesserte Operationstechniken und besonders der Einsatz hochwirksamer Immunsuppressiva dazu, dass Organtransplantationen heute zur klinischen Routine gehören. Insbesondere Cyclosporin wird seit 1983 zur Prophylaxe der akuten Transplantatabstoßung eingesetzt. Auf diese Weise konnte die Frühletalität nach Herztransplantation deutlich verbessert werden [2, 3]. Heute liegt sie unter 15 % [4, 5].

Ein Problem, das jedoch bis heute die Langzeiterfolge unbefriedigend erscheinen lässt, ist die Spätletalität und ihre Ursache, die sogenannte Transplantatvaskulopathie, die sich mit einer Prävalenz von 45 % bereits nach drei Jahren finden lässt [6]. Jährlich entwickeln 15-20 % der transplantierten Patienten eine akzelerierte Form der Koronarsklerose.

Aufgrund der Denervierung des Spenderherzens entwickeln die Patienten normalerweise keine Symptome der Angina pectoris sondern versterben entweder an einer progredienten Herzinsuffizienz oder am plötzlichen Herztod [7].

Schon in der Pionierzeit der Herztransplantation konnte eine Koronarsklerose für den progredienten Funktionsverlust der transplantierten Organe verantwortlich gemacht werden, obwohl eine suffiziente Immunsuppression die akute Abstoßung verhinderte. Bereits der zweite Herztransplantationspatient entwickelte innerhalb weniger Monate eine so ausgedehnte

Transplantatvaskulopathie, dass er daran verstarb, obwohl der Spender erst 24 Jahre alt gewesen war [8, 9, 10].

Verschiedene in der Zwischenzeit erschienene Berichte über die Entwicklung der Transplantatvaskulopathie konnten zeigen, dass sie sich bereits 3 Monate nach der Transplantation und selbst bei Kleinkindern entwickeln kann [6, 11, 12, 13, 14, 15, 16].

Mit der vorliegenden Untersuchung wurde angestrebt, die Infiltration von Leukozyten und ihren Subpopulationen im Gewebe transplanter Herzen unter Therapie mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin zu untersuchen. Hierbei wurde ein Kleintiermodell (Ratte) verwendet, das eine Transplantatvaskulopathie ausbildet ohne akut abzustoßen [17].

2. METHODEN UND STUDIENDESIGN

2.1 Studiendesign, Versuchstiere, Dosierungen

2.1.1 DAS STUDIENDESIGN

Ziel der Studie war der Vergleich zweier herztransplantierte Versuchstiergruppen. Eine Gruppe wurde daher nach der Transplantation immunsuppressiv behandelt, die andere Gruppe blieb unbehandelt. Als Immunsuppressivum wurden den Tieren der immunsupprimierten Gruppe ausschließlich **Cyclosporin A** (CsA) appliziert.

Der Untersuchungszeitraum war auf 60 Tage angelegt, wobei ein Teil der Versuchstiere jeweils an den Tagen 1, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56 und 60 sakrifiziert wurde, um kontinuierlich Daten über immunologische Veränderungen im myokardialen Gewebe erheben zu können. Aus dieser zeitlichen Versuchsanordnung ergaben sich 23 Messpunkte.

Da die Reihenfolge der Tötungen vor Versuchsbeginn in einer Liste randomisiert worden war, stand sie in keinem regelmäßigen Zusammenhang zu der Transplantationsfolge. Zu jedem Messpunkt des Untersuchungszeitraumes wurden in der mit Cyclosporin A behandelten Gruppe sowie in der unbehandelten Gruppe jeweils drei Tiere sakrifiziert. Daraus ergab sich für jede Gruppe eine Gesamtzahl von jeweils 69 Tieren.

2.1.2 DIE VERSUCHSTIERE

Als Empfängertiere dienten männliche, acht Wochen alte Ratten des Inzuchtstammes Fischer 344 (Harlan Winkelmann GmbH, Borcken) mit einem Gewicht zwischen 175g und 210g.

Als Spendertiere wurden männliche Ratten im Alter von 7 Wochen des Inzuchtstammes Lewis (Harlan Winkelmann GmbH, Borcken) mit einem Gewicht von 200g – 240g verwendet [17]

2.1.3 DIE HALTUNG DER VERSUCHSTIERE

Die Haltung der Tiere erfolgte in der Versuchstieranlage der Universitätsklinik der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main. Die Tiere befanden sich daher unter einer kontinuierlichen veterinärmedizinischen Kontrolle durch den leitenden Tierarzt der Versuchstieranlage.

Unmittelbar nach der Ankunft wurden die Tiere in Standard-Nager-Käfigen „Makrolon“ zu maximal fünf Tieren pro Käfig aufgeteilt.

Gefüttert wurden die Tiere mit einer Standard-Diät für Ratten und Mäuse (Atromin Standard-Diät). Frisches Wasser erhielten die Tiere täglich ad libitum. Der Stall wurde von 6 Uhr bis 19 Uhr beleuchtet; die Raumtemperatur lag kontinuierlich bei $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Am Tag vor der Transplantation wurden die Tiere in Einzelkäfige umgesetzt und blieben bis zur Operation nüchtern, bei weiterhin frei verfügbarem Wasser. Post transplantationem wurden die Tiere mit einem Ohrclip markiert und bis zur Organentnahme weiterhin in Einzelkäfigen gehalten.

2.1.4 DIE MEDIKAMENTENZUBEREITUNG UND DEREN APPLIKATION

Die Tiere erhielten unmittelbar nach der Transplantation 3mg Cyclosporin A pro Kilogramm Körpergewicht. Anschließend erhielten sie während ihrer gesamten Überlebenszeit täglich 3mg/kg KG Cyclosporin A. Die Applikation erfolgte subcutan und wurde unter das Nackenfell appliziert.

2.2 Transplantationsmethode, Explantationsmethode, Narkose

2.2.1 DAS TRANSPLANTATIONSMODELL

Die heterotope Herztransplantation erfolgte nach der Methode von Ono und Lindsey [18].

Das Transplantat wurde heterotop in das Abdomen der Empfängertiere implantiert [19]. Die Aorta ascendens des Spenderorgans wurde dabei End-zu-Seit mit der Aorta abdominalis des Empfängertiers anastomosiert. Die Arteria pulmonalis des Spenderherzens wurde mit der Vena cava des Empfängers ebenfalls End-zu-Seit verbunden. Daraus resultiert ein „non working heart“-Modell. Die Perfusion des Transplantates mit arteriellem Blut wird über die Koronararterien gewährleistet. Das venöse Blut fließt über des Sinus coronarius in den rechten Vorhof und von da in die rechte Kammer und über die Arteria pulmonalis in den Empfängerkreislauf.

2.2.2 DIE VORBEREITUNG ZUR OPERATION UND DIE NARKOSE

Zur Einleitung der Narkose wurden die Tiere in einen Raum mit einer Kohlendioxid Atmosphäre gebracht, wo sie in einen CO₂-Rausch versetzt wurden. Anschließend erfolgte die intraperitoneale Injektion von 12,5 mg Nembutal® (Phenobarbital). Nembutal wurde hierzu mit isotoner Kochsalzlösung im Verhältnis 1: 10 verdünnt. Zeigte sich während der Operation, dass die Narkosetiefe der Tiere abflachte, wurde Nembutal in 5mg Portionen unverdünnt, bis zur gewünschten Narkosetiefe, mit einer Insulinspritze in das eröffnete Abdomen titriert.

Nach Einleitung der Narkose erfolgte die Rasur des Operationsfeldes.

2.2.3 DIE EXPLANTATION DES SPENDERORGANS

Als Spender dienten Ratten des Inzuchtstammes „Lewis“. Nach Hautschnitt und Eröffnung des Thorax durch einen schräg verlaufenden Schnitt vom Xyphoid nach kranial beidseitig in Richtung Humeroclaviculargelenk konnte die vordere Thoraxwand nach kranial weggeklappt und offen fixiert werden. Nun wurde der mediastinale Situs dargestellt, indem das Perikard mit Mikropinzetten vom Herzen abgehoben wurde. Jetzt wurde der rechte Vorhof mit einer feinen Kanüle punktiert. Über dieselbe wurde anschließend solange eine 4° Celsius kalte Ringerlaktat Lösung mit 200 I.E. Heparin pro Milliliter injiziert, bis die Herzaktion zum Sistieren kam. Es erfolgte die Ligatur und Durchtrennung der Vena cava superior und inferior unmittelbar oberhalb ihres Durchtrittes durch das Diaphragma beziehungsweise oberhalb des rechten Atriums. Die Venae pulmonales wurden gemeinsam mit 7/0 Prolene (Fa. Ethicon) ligiert. Durch Absetzen des Herzens unmittelbar hinter dieser Massenligatur konnte das Herz jetzt vollständig mobilisiert werden. Anschließend wurden Arteria pulmonalis unmittelbar vor ihrer Aufzweigung in den rechten und linken Hauptast sowie die Aorta ascendens stumpf präpariert und 2-3 mm distal ihres Ursprungs am Herzen, beziehungsweise vor dem Abgang der rechten A. carotis abgesetzt.

Das explantierte Organ wurde bis zur Implantation in einer 4°C kalten Ringerlactat-Lösung aufbewahrt.

2.2.4 DIE OPERATION DES EMPFÄNGERTIERS

Als Empfänger dienten „Fisher 344“ Ratten. Die Narkose des Empfängertiers wurde in gleicher Weise eingeleitet und fortgeführt (s.2.2.2).

Nach medianer Laparotomie und Luxation der Intestinalorgane auf die rechte Seite erfolgte die Eröffnung des Retroperitoneums. Die infrarenale Aorta sowie die Vena cava inferior kamen so zur Darstellung und konnten präpariert werden. Die Aorta wurde unmittelbar unterhalb der Nierenarterienabgängen sowie nochmals ca. 1 cm darunter mit Mikroclips abgeklemmt. Mit dem Inzisionsskalpell erfolgte jetzt die Längsarteriotomie, die mit der Pottschen-Schere erweitert wurde, so dass sie dem Lumen der Spenderaorta entsprach. Mit der Vena cava inferior wurde analog verfahren. Nun wurde das Spenderherz so in das Abdomen eingebracht, dass der Stumpf der A. pulmonalis nach rechts lateral und kaudal ohne Verdrehung zu liegen kam.

Nach Anlegen der unteren und oberen Ecknaht als Einzelknopfnähte (Prolene 7×0), wurde von dort die Vorderseite der Anastomose in fortlaufender Nahttechnik genäht. Dann wurde das Transplantat über die Wirbelsäule nach links lateral gelegt, so dass die Rückseite der arteriellen Anastomose frei lag und es wurde ebenfalls in evertierter Nahttechnik von kranial nach kaudal genäht (s.

Abbildung 1). Die beiden Fäden wurden miteinander verknotet.

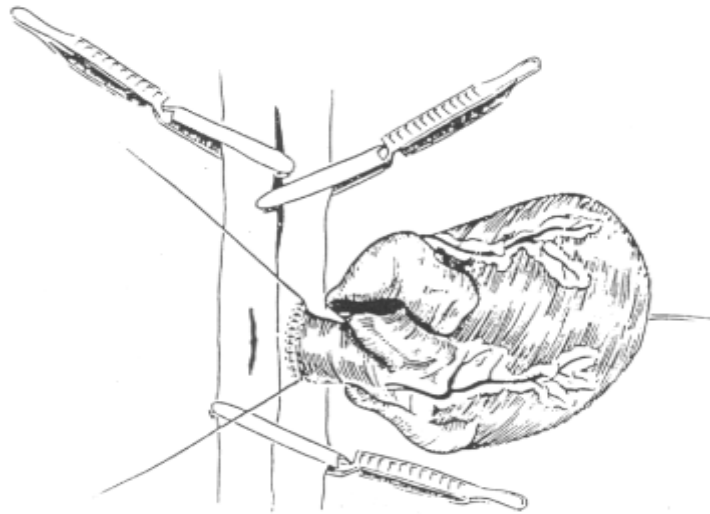


Abbildung 1: Aorto - aortale Anastomose

Bei links liegendem Transplantat wurde die Vena cava inferior, wie oben beschrieben, abgeklemmt und inzidiert, wobei die Venotomie links lateral angelegt wurde. Die Arteria pulmonalis wurde bis zur eindeutigen Darstellung der Lumina angespült, so dass die erste untere Ecknaht in Einzelknopftechnik erfolgen konnte. Anschließend wurde die obere Ecknaht angelegt, so dass die Rückseite unter Spannung stand und kürzer als die Vorderseite genäht werden konnte. Dadurch kam die Anastomose ideal zur Darstellung. Zur Naht der Vorderseite wurde das Transplantat erneut nach rechts umgelagert und in fortlaufender Nahttechnik von kranial nach kaudal genäht (s.

Abbildung 2).

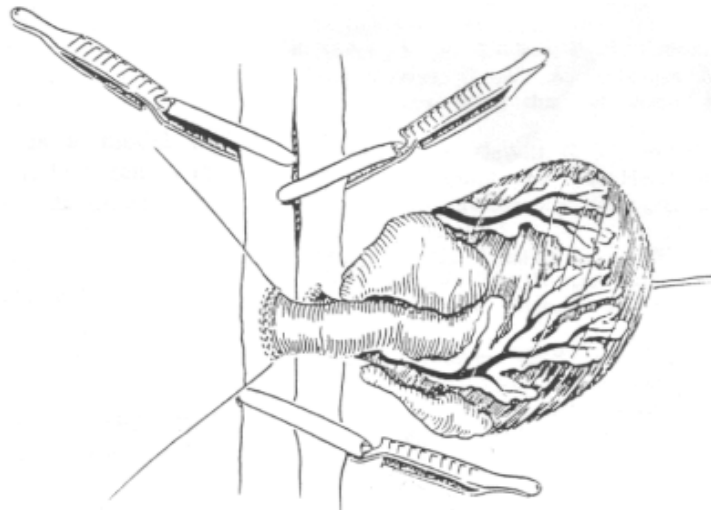


Abbildung 2: Arteria pulmonalis - Vena cava Anastomose

Nachdem der Blutfluss durch Entfernen der mikrochirurgischen Clips freigegeben wurde, kam es unmittelbar zu einer gut sichtbaren Perfusion des nunmehr rosig erscheinenden Organs. Um eine schnellere Erwärmung zu erreichen, wurde der Situs mit 35° Celsius warmer isotoner Kochsalzlösung gespült.

Initial kam es fast immer zu Kammerflimmern, das jedoch durch vorsichtige Kompression des Transplantates mit dem Finger terminiert und in einen Sinusrhythmus konvertiert werden konnte.

Die durchschnittliche Ischämiezeit lag bei 22 Minuten. In der Regel setzte - maximal zwei Minuten nach Freigabe des Blutflusses - der Sinusrhythmus ein. Für die ersten Minuten nach Einsetzen des Sinusrhythmus kam es meist zu einer bradykarden Phase, die sich dann jedoch bald zu einer Normofrequenz von 120 bis 200 Schlägen pro Minute steigerte.

Die Zeit bis zum Erreichen des Sinusrhythmus wurde noch einmal zur Inspektion des Situs auf vollständige Bluttrockenheit benutzt. Kleinere Nachblutungen konnten meist durch einfache Kompression mit einem Watteträger beherrscht werden. Reichte dies zur Blutstillung nicht aus, wurde die entsprechende Stelle mit 9X0 Prolene übernäht.

Zum Abschluß wurden die nach rechts ausgelagerten und in eine feuchte Kompresse eingeschlagene Intestinalorgane wieder vorsichtig in die Bauchhöhle zurückverlagert und mit dem Omentum majus überdeckt. Jetzt folgte der schichtweise Wundverschluß, zuerst der Bauchdeckenfaszie in fortlaufender Technik mit Vicryl 4X0 und anschließend die Hautnaht in Einzelknopftechnik mit Prolene 4X0.

Die Operationszeiten lagen in einem Bereich zwischen 60 und 90 Minuten. Die operative Letalität lag bei 8%. Unmittelbar nach der Operation wurden die Tiere mit einem Ohrclip markiert und randomisiert in eine entsprechende Gruppe aufgenommen. Bis zum vollständigen Erlangen des Bewußtseins wurden die Tiere kontinuierlich überwacht. Bei einer in den ersten postoperativen Stunden zu beobachtenden Flüssigkeitsinappetenz wurde den Tieren subcutan isotone Kochsalzlösung unter das Nackenfell gespritzt.

2.2.5 DER POSTOPERATIVE VERLAUF

Die Tiere wurden in dem Zeitraum zwischen Transplantation und Explantation täglich klinisch visitiert, wobei besonderes Augenmerk auf die Vitalität der Tiere und den Glanz des Fells als Parameter für den Hydrationszustand gelegt wurde. Außerdem wurde die Trinkmenge bestimmt und das Körpergewicht gemessen und protokolliert. Bei nicht ausreichender Flüssigkeitsaufnahme, wurde Flüssigkeit in Form von isotoner Kochsalzlösung wie oben beschrieben substituiert.

Desweiteren wurde täglich durch Palpation der Herzaktion durch die Bauchwand der Funktionszustand des Transplantates beurteilt und protokolliert. Dabei wurde das in Tabelle 1 dargestellte Schema angewendet.

4	normale, kräftige Kontraktilität
3	gute aber reduzierte Kontraktilität
2	deutlich geminderte Kontraktilität
1	Fibrillation des Transplantates
0	keine Funktion

Tabelle 1: Beurteilung der Herzfunktion

2.2.6 DIE EXPLANTATION

Die Sakrifizierung der transplantierten Tiere fand am Tag 1 und 2, dann in einem zweitägigen Abstand bis zum Tag 28 und von da an bis zum Tag 60 in viertägigem Abstand statt.

Zur Explantation wurden die Tiere ebenfalls mit Pentobarbital i.p. narkotisiert. Durch eine kombinierte mediale Laparotomie und Thoracotomie konnte das allogene Herz im Abdomen sowie der thorakale Situs dargestellt werden. Nach Antikoagulation durch Injektion von 2500 I.E. Heparin in die abdominale Vena cava wurde selbige supraphrenisch durchtrennt. Das sich in den Sinus phrenico-costales sammelnde Blut wurde mit einer Insulinspritze aufgefangen und stand für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Das transplantierte Herz wurde nach Punktion der Vorhöfe mit Ringerlactat-Lösung durchspült und auf Höhe der Anastomosen abgetrennt. Nach Entnahme wurde das Herz in zwei Teile geteilt. Die apicale Hälfte des Herzens wurde sofort in 4° Celsius kalter Ringerlactat-Lösung konserviert und zur sofortigen

Weiterverarbeitung transportiert. Die Herzbasis wurde sofort für spätere Paraffinschnittuntersuchungen eingefroren.

Die Weiterverarbeitung des myokardialen Gewebes sowie die Analyse der das Transplantat infiltrierenden Leukozyten erfolgte unmittelbar nach der Explantation in dem chirurgischen Transplantationslabor des Universitätsklinikums Frankfurt am Main.

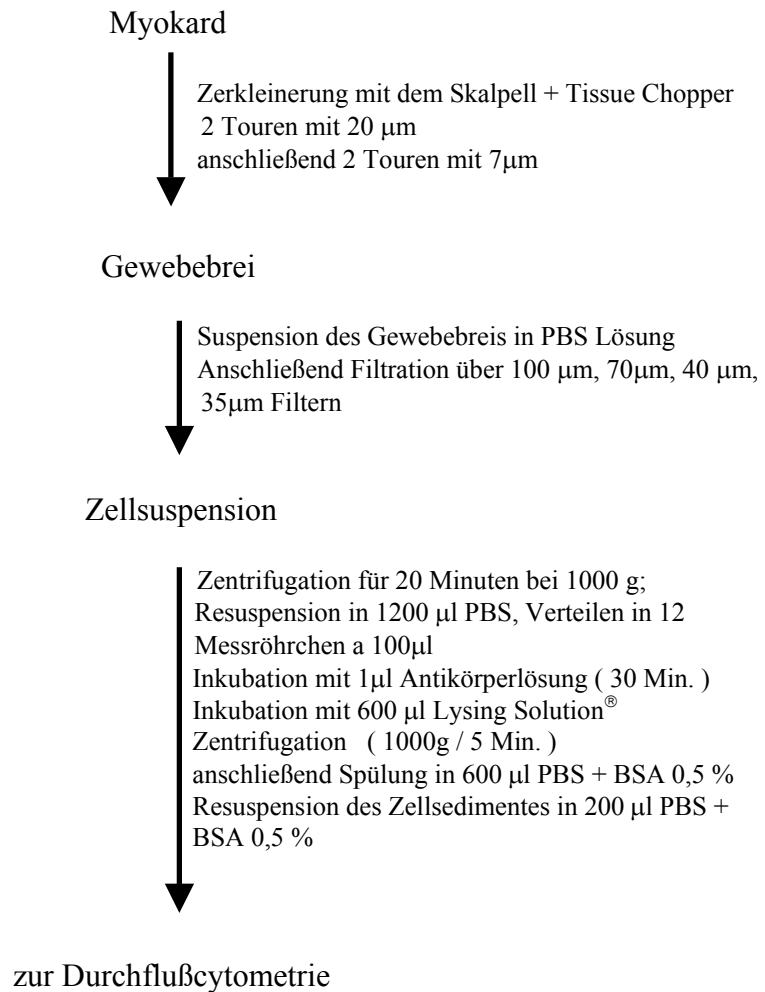
2.3 Aufarbeitung des Präparats und Durchflußcytometrie

Alle Laborarbeiten fanden wegen der Lichtempfindlichkeit der verwendeten Antikörper in abgedunkelten Räumen statt.

2.3.1 AUFARBEITUNG DES PRÄPARATS

Die im Durchschnitt 100mg schweren Herzscheiben wurden in unserem Labor zuerst mit einem Skalpell klein geschnitten und dann mit einem Tissue Chopper® (Mc Ilwain, The Mickle Laboratory Engeneering) zwei Touren mit 20 µm sowie anschließend zwei Touren mit 7µm Schnittabstand bearbeitet. Der dabei entstehende Gewebebrei wurde in 15ml PBS (Dulbecco`s, Gibco BRL, w/o calcium + magnesium, w/o sodium bicarbonat) suspendiert und dann über 100µm, 70µm, 40µm und zum Schluß 35µm (Cell Strainer®, Falcon) filtriert. Die auf diese Weise gewonnene Zellsuspension wurde unmittelbar im Anschluß für 20 Minuten bei 15° Celsius und 1000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1200µl PBS resuspendiert und in 12 Messröhrchen (Falcon) a 100µl pipettiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension mit jeweils 1µl der jeweiligen Antikörperlösung versetzt und bei +4°Celsius 30 Minuten lang in

dunkler Umgebung inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension mit 600µl Lysing Solution®(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, 10x Konzentrat in aqua dest. zehnfach verdünnt) aufgefüllt und wieder 10 Minuten bei +4°Celsius und in Dunkelheit inkubiert. Bei diesem Vorgang wurden die Erythrozyten, die bei der Messung stören würden, zerstört. Anschließend wurde wieder für 5 Minuten bei +4°Celsius und 1000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellsediment in 600µl PBS + BSA 0,5% (bovines Albumin, Sigma) resuspendiert. Es folgte die Wiederholung dieses Vorgangs. Zum Schluß wurde das Zellsediment in 200 µl PBS + BSA 0,5% zur Messung suspendiert. Gemessen wurde mit Fluorescence Activated Cell Analyser der Firma Becton Dickinson (FACSscan). Die Auswertung erfolgte mit der Software Lysys II Vers. 1.1, 2/6/92 (Becton Dickinson).



2.3.2 DIE VERWENDETEN ANTIKÖRPER

Bei den Versuchen wurden monoklonale, Fluoreszeinisothiocyanat markierte Antikörper verwendet, die gegen bestimmte Oberflächenproteine auf Rattenleukozyten gerichtet waren.

Bei Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) handelt es sich um einen Farbstoff, dessen maximales Absorptionsspektrum bei 492 nm liegt und bei Anregung in einem Bereich von 520 nm fluoresziert.

2.3.2.1 CD 2

Der CD 2 markierende Antikörper stammte von der Firma Pharmingen (10975 Torreyana Road, San Diego, USA). Es handelte sich um einen FITC markierten Maus-anti-Ratte Antikörper des Isotyps Maus IgG_{2a}, κ (Klon OX-34). Der Antikörper reagiert mit dem Immunglobulinadhäsionsmolekül CD 2 (LFA-2), das den Rezeptor für LFA-3 darstellt. Bei der Ratte wird CD 2 auf Thymozyten, „Natural Killer“- Zellen, T-Lymphozyten sowie Oberflächen-Macrophagen jedoch nicht auf B-Lymphozyten und peritonealen Macrophagen exprimiert. Wir verwendeten die Originallösung 1: 20 verdünnt .

2.3.2.2 CD 3

Der CD 3 markierende Antikörper stammte von der Firma Pharmingen. Es handelte sich um einen FITC markierten Maus-anti-Ratte Antikörper des Isotyps Maus IgG₃, κ (Klon G4.18). Der Antikörper reagiert mit dem CD 3 Oberflächen Antigen, das auf T-Lymphozyten zu finden ist. Wir verwendeten die Originallösung 1: 20 verdünnt .

2.3.2.3 CD 4

Der CD 4 markierende Antikörper stammte von der Firma Biosource (820 Flynn Road, Camarillo, CA 93012, USA). Es handelte sich um einen FITC gekoppelten Maus-anti-Ratte Antikörper des Isotyps Maus IgG₁ (Klon W3/25). Der Antikörper reagiert mit T-Helferzellen der Ratte sowie mit Thymozyten und Macrophagen, die zum großen Teil dieses Antigen exprimieren. Wir verwendeten die Originallösung 1: 100 verdünnt .

2.3.2.4 CD 5

Der CD 5 markierende Antikörper stammte von der Firma Pharmingen. Es handelte sich um einen FITC gekoppelten Maus-anti-Ratte Antikörper des Isotyps Maus IgG₁, κ (Klon OX-19). Der Antikörper reagiert mit dem CD 5 Antikörper, der Thymozyten, peripheren T-Lymphozyten. Er reagiert nicht mit NK-Zellen. Eine Reaktion mit CD 5 exprimierenden B-Lymphozyten der Ratte wurde nicht nachgewiesen. Wir verwendeten die Originallösung 1: 20 verdünnt .

2.3.2.5 CD 8

Der CD 8 markierende Antikörper stammte von der Firma Biosource. Es handelte sich um einen FITC gekoppelten Maus-anti-Ratte Antikörper des Isotyps IgG₁ (Klon MRC OX-8). Der Antikörper reagiert mit Thymozyten, einer Suppopulation von peripheren T-Lymphozyten, granulierten intraepithelialen Leukozyten und der Mehrheit der NK-Zellen. Wir verwendeten die Originallösung 1: 50 verdünnt .

2.3.2.6 CD 11a

Der CD 11a markierende Antikörper stammte von der Firma Pharmingen. Es handelte sich um einen FITC gekoppelten Maus-anti-Ratte Antikörper des Isotyps IgG_{2a}, κ (Klon WT.1). Der Antikörper reagiert mit der α Untereinheit von LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$ Integrin, CD 11a/CD 18), einem Oberflächenglycoprotein, das auf den meisten Leucozyten gefunden wird. Wir verwendeten die Orginallösung 1: 100 verdünnt .

2.3.2.7 CD 11b

Der CD 11b markierende Antikörper stammte von der Firma Biosource. Es handelte sich um einen FITC gekoppelten Maus-anti-Ratte Antikörper des Isotyps IgG_{2a} (Klon MRC OX-42). Der Antikörper reagiert mit Macrophagen, Kupffer Sternzellen, dendritische Zellen, Mikroglia-Zellen des Gehirns und Granulozyten. Wir verwendeten die Orginallösung 1: 50 verdünnt .

2.3.2.8 CD 18

CD 18 markierende Antikörper stammte von der Firma Pharmingen. Es handelte sich um einen FITC gekoppelten Maus-anti-Ratte Antikörper des Isotyps IgG₁, κ (Klon WT.3). Der Antikörper reagiert mit der 95-100 kDa β_2 Untereinheit (CD 18), die bei der Mehrheit der Leukozyten, in Form eines Heterodimers, mit einem der drei verschiedenen CD11 α Integrin Untereinheiten (CD 11a/ α_L , CD 11b/ α_M , CD 11c/ α_X), LFA-1, Mac-1 und gp150 exprimiert werden. Wir verwendeten die Orginallösung 1: 20 verdünnt .

2.3.2.9 CD 25

Der CD 25 markierende Antikörper stammte von der Firma Biosource. Es handelte sich um einen FITC gekoppelten Maus-anti-Ratte Antikörper des Isotyps IgG₁ (Klon MRC Ox-39). Der Antikörper reagiert mit einem 55 kD Glycoprotein, das den Interleukin-2 Rezeptor der Ratte darstellt. Das Antigen erscheint auf aktivierten T-Lymphozyten und dendritischen Zellen des Thymus. Wir verwendeten die Orginallösung 1: 20 verdünnt .

2.3.2.10 CD 45RA

Der CD 45RA markierende Antikörper stammte von der Firma Biosource. Es handelte sich um einen FITC gekoppelten Maus-anti-Ratte Antikörper des Isotyps IgG₁ (Klon MRC OX-33). Der Antikörper reagiert mit B-Lymphozyten entlang des Ductus thoracicus. Wir verwendeten die Originallösung 1: 20 verdünnt .

2.3.2.11 CD 49d

Der CD 49 (Integrin α_4 Ketten) markierende Antikörper stammte von der Firma Pharmingen. Es handelt sich um einen FITC gekoppelten Maus-anti-Ratte Antikörper des Isotyps IgG_{2a}, κ (Klon MR α_{4-1}). Der Antikörper reagiert mit der α_4 Untereinheit, die als Heterodimer mit einer der beiden β Untereinheiten β_1 oder β_7 exprimiert wird. Das $\alpha_4\beta_1$ Integrin (VLA-4, CD 49d/CD 29) wird auf peripheren T- und B-Lymphozyten, Thymozyten, Mastzellen und Monozyten exprimiert, während $\alpha_4\beta_7$ Integrin (LPAM-1) zwar auf peripheren Lymphozyten, jedoch nur auf einem geringen Teil der Thymozyten gefunden wird. Wir verwendeten die Originallösung 1: 10 verdünnt .

2.3.2.12 CD 71

Der CD 71 markierende Antikörper stammte von der Firma Serotec (camon Labor-Service, Wiesbaden). Es handelte sich um einen FITC gekoppelten Maus-anti-Ratte Antikörper des Isotyps IgG_{2a} (Klon MRC OX-26). Der Antikörper reagiert mit dem Transferrin Rezeptor der Ratte. Er markiert in Teilung begriffene Zellen verschiedener Arten, bindet jedoch zum Teil ebenfalls an nicht in Teilung begriffene Epithelzellen sowie Endothelzellen in Gehirnkapillaren. Lymphopoetischen Stammzellen des Knochenmarks sowie foetales Lebergewebe werden durch den Antikörper nicht markiert. Wir verwendeten die Originallösung 1: 20 verdünnt .

2.3.3 DIE DURCHFLUßZYTOMETRISCHE MESSUNG (FACS)

Die Messung wurde mit einem FACScan (Fluorescence Activated Cell Analyzer) der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Die Berechnung erfolgte mit einem Hewlett Packard 9000-340 Rechner, der mit dem Messgerät verbunden war.

Für die Berechnung wurde das Programm Lysis II Vers. 1.1 der Firma Becton Dickinson Immunocytometry Systems verwendet.

Nach Vorbereitung des Gerätes erfolgte die Messung der Proben. Dazu wurde der Inhalt des Probengefäßes durch einen Unterdruck von dem Gerät angesaugt und mit einer definierten

Menge Trägerflüssigkeit (FACS Sheat-Fluid) verdünnt. Mit konstanter Flussrate floss die Probe dann durch eine dünne, durchsichtige Glasröhre, auf die ein Laserstrahl gerichtet war. Passierte eine Zelle, die sich in der Probe befand, den Laserstrahl, wurde dieser zum einen gestreut, zum anderen regte er, wenn markierte Antikörper an der Zelle gebunden hatten, die Emission des Fluoreszenzfarbstoffs an. Durch Photodetektoren wurden folgende Meßwerte erfaßt:

- die **Vorwärtsstreuung** (forward scatter FSC), als ein Maß für die Größe der gemessenen Zelle
- die **Seitwärtsstreuung** (sideward scatter SSC), als ein Maß für die Granularität der Zelle die so Ihre Differenzierung erlaubt
- die „**erste**“ **Fluoreszenz** (FL 1), die im Emmissionsbereich des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs FITC liegt.

Die erste Fluoreszenz zeigte an, welche Zellen den markierten Antikörper gebunden hatten und somit ein bestimmtes Merkmal exprimierten. Zum anderen zeigte sie die Dichte des untersuchten Oberflächenmerkmals bzw. des Rezeptors je Zelle an, da die Fluoreszenzintensität um so höher war, je mehr Antikörper auf der Zelloberfläche gebunden wurden.

Eine schematische Darstellung der Funktionsweise des Durchflußzytometers wurde in Abbildung 3 dargestellt. Pro Probe wurden insgesamt 5000 Zellen gemessen. Die Meßergebnisse wurden auf 3,5 " Disketten zur späteren Auswertung gespeichert.

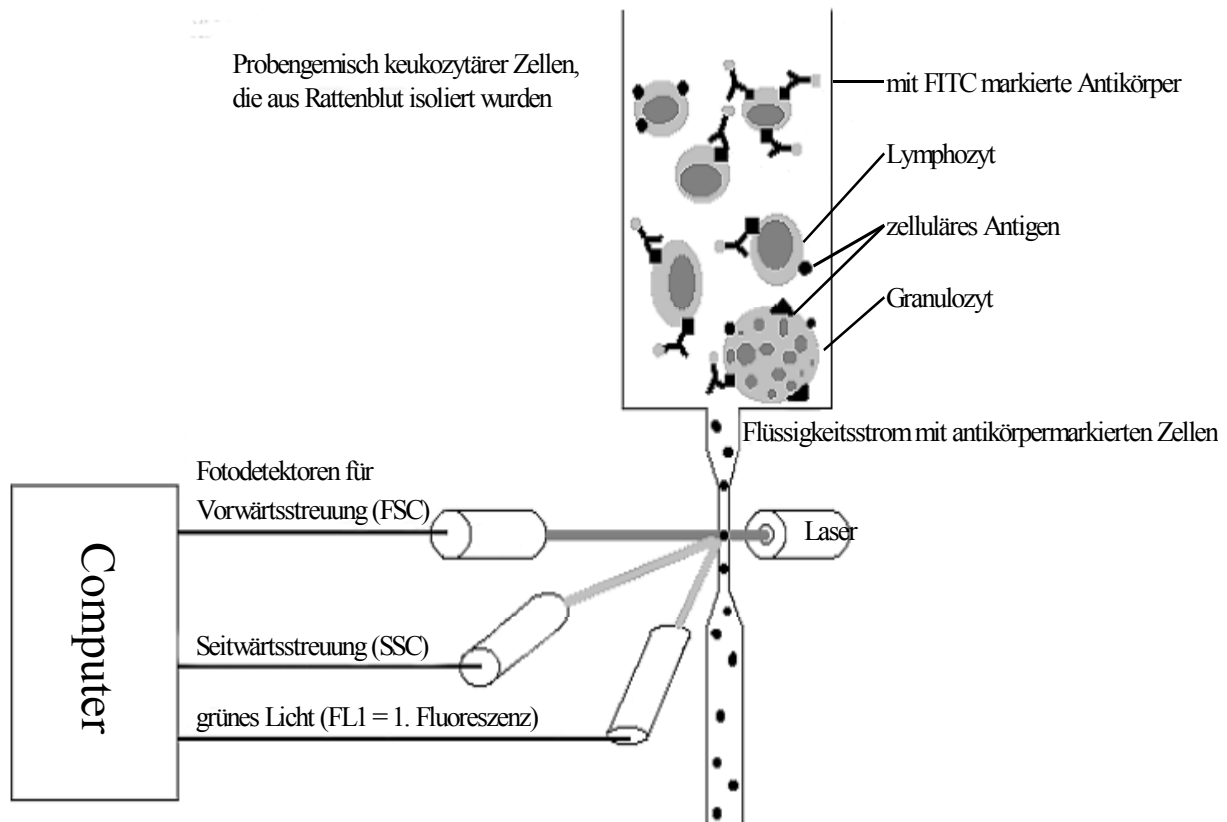


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Durchflußzytometers

2.3.4 DIE AUSWERTUNG DER MESSERGEBNISSE

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit dem Programm WinMDI 2.6. Zunächst wurden die erfassten Werte für jede Zelle in einem Koordinatensystem (Dotplot) dargestellt (s. Abbildung 4). Hierbei wurde die Intensität der Seitwärtsstreuung (SSC) gegen die Intensität der Vorwärtsstreuung (FSC) aufgetragen. Daraus resultierte ein Diagramm, das einer Darstellung der Zellen nach Größe und Granularität entsprach. Kleine, wenig granulierte Zellen wurden nahe dem Ursprung, große, stark granulierte Zellen im oberen rechten Quadranten des Koordinatensystems abgebildet.

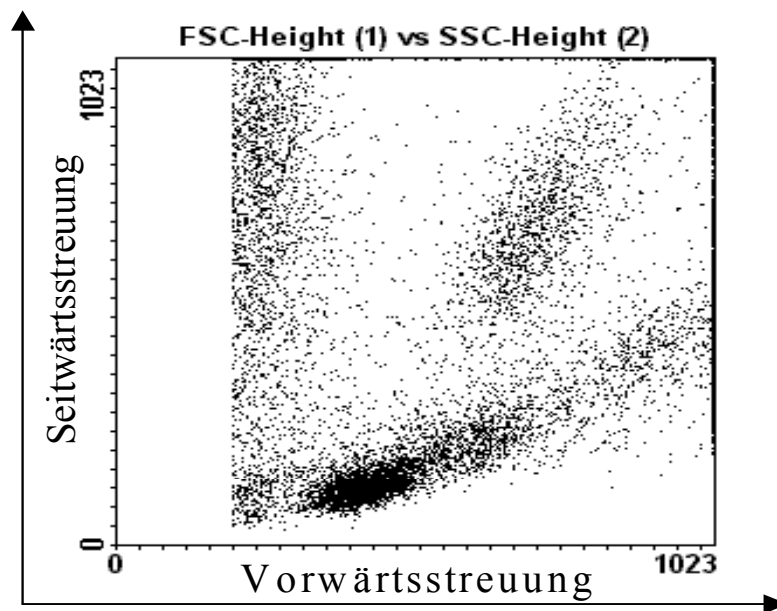


Abbildung 4: Darstellung der Meßergebnisse als Dotplot (erster Schritt)

In dieser Darstellung wurde nun die Region (R1), die den Lymphocyten entsprach, markiert (s. Abbildung 5).

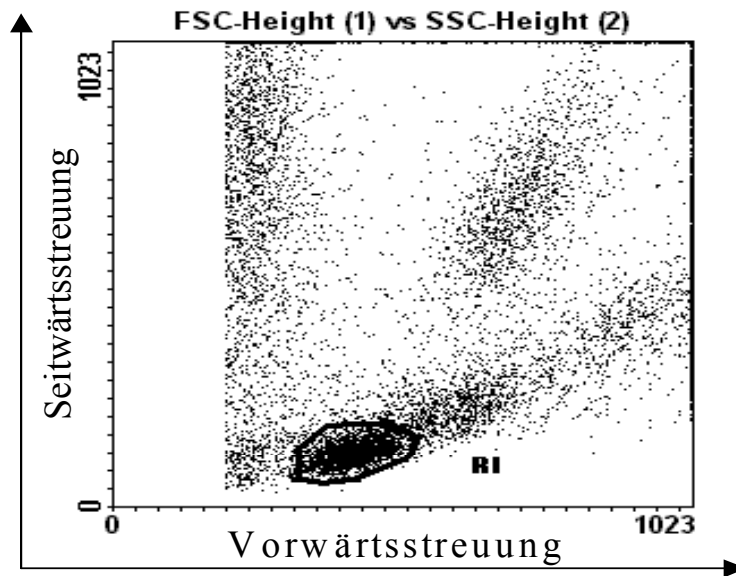


Abbildung 5: Markierte "Lymphozytenwolke" im Dotplot (zweiter Schritt)

Alle Zellen, die sich innerhalb dieser Region (R1) befanden, wurden dann als Histogramm dargestellt. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität (FL1) logarithmisch gegen die Zellzahl (events) aufgetragen (s.

Abbildung 6).

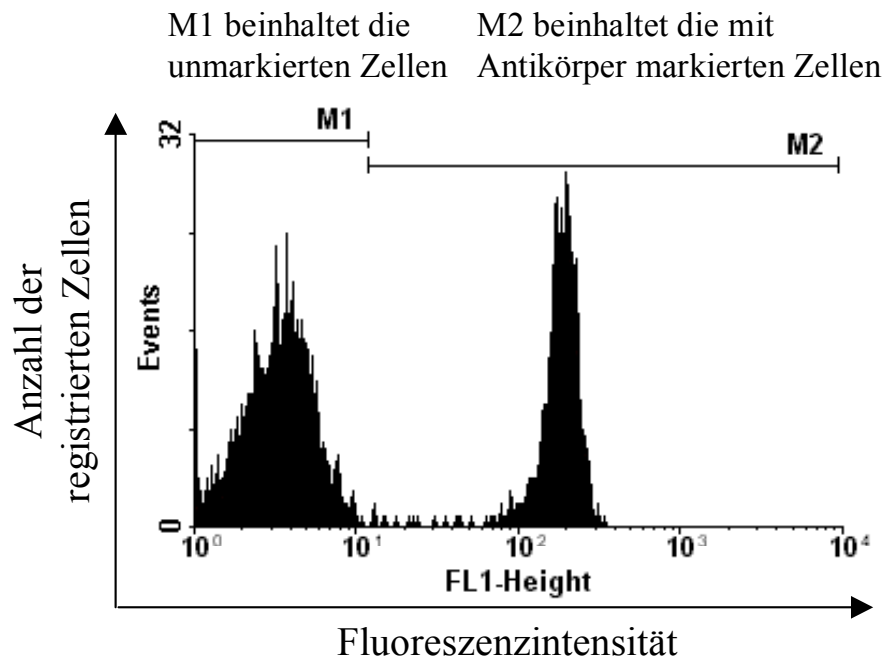


Abbildung 6: Darstellung der Fluoreszenzwerte im Histogramm

In dieser Darstellung wurden die markierten, das entsprechende Antigen exprimierende Zellen, und die unmarkierten, das entsprechende Antigen nicht exprimierende Zellen, durch das Setzen von Markern (M1 und M2) getrennt. Mit Hilfe des Programms konnte man nun sowohl den prozentualen Anteil der positiven Zellen innerhalb der gesetzten Marker als auch die durchschnittliche Stärke der Fluoreszenz berechnen.

2.3.5 STATISTIK

Bei der Auswertung zeigte sich, dass die Probenzahl von drei Messwerten pro Messpunkt zu gering für eine statistische Auswertung war. Daher wurden vom zweiten Tag an jeweils zwei Messpunkte zusammengefaßt. Dadurch verringerte sich zwar die Anzahl der Messpunkte von 23 auf 12, die Anzahl der Messwerte pro Messpunkt verdoppelte sich aber auf sechs. Dies ermöglichte eine statistische Auswertung mit dem unpaaren zweiseitigen **t-Test**. Dieser wurde

für die Bestimmung von Unterschieden der prozentualen Häufigkeit im Auftreten bestimmter Oberflächenmerkmale von Leukozyten im transplantierten Gewebe mit und ohne Immunsuppression benutzt.

Eine Zahl p , die kleiner 0,05 war, wurde von uns als statistisch signifikant angesehen. Als Ausgangswert für die graphische Darstellung diente der Median, aus den für diesen Messpunkt gemessenen Werte.

3. ERGEBNISSE

3.1 Expression von leukozytenspezifischen Antigenen im Herzgewebe transplantiertter Ratten ohne Behandlung sowie nach Immunsuppression mit Cyclosporin A

3.1.1 EXPRESSION VON CD 2 REZEPTOREN

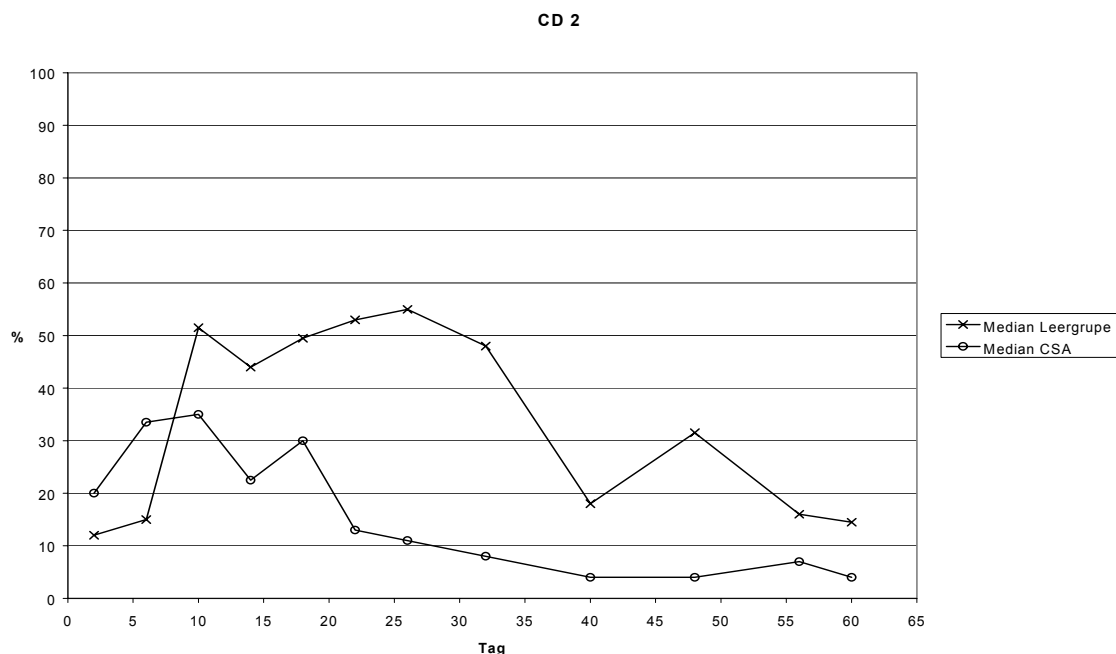


Abb.3.1: Grafische Darstellung des Anteils CD 2 Rezeptoren exprimierender Zellen im transplantierten Rattenherz. Vergleich einer unbehandelten sowie einer mit Cyclosporin A behandelten Gruppe.

Der Anteil an Zellen, die einen CD 2 Rezeptor exprimieren nimmt am Tag 2 des Untersuchungszeitraums einen Anteil von 12 % für die Leergroupe und 20 % für die immunsupprimierte Gruppe ein. Wie in *Abbildung 3.1* zu sehen ist, steigt der Anteil in beiden Gruppen bis zum Tag 10 wobei der größte Anstieg für die CSA Gruppe zwischen dem 2. und 6. Tag, für die Leergroupe jedoch zwischen dem 6. Und 10. Tag liegt. In der behandelten

Gruppe erreicht der Anteil CD 2 positiver Zellen am 10. Tag mit 35 % seinen Höchststand. Von hier an fällt er, mit Ausnahme eines kurzen Anstiegs zwischen dem 4. und 18. Tag, kontinuierlich bis auf unter 10 % am 32. Tag. Der in der Leergruppe bis zum 10. Tag erreichte Wert von 51,5 % bleibt relativ konstant um 50 % (Höchstwert bis Tag 26 bei 55 %). Ab dem 32. Tag fällt der Anteil von CD 2 Rezeptor exprimierenden Zellen bis zum 40. Tag auf unter 20 % ab. Mit Ausnahme eines nun folgenden Anstiegs auf 31,5 % bis zum 48. Tag fällt der Anteil bis zum Ende des Versuchszeitraums auf 14,5 %.

Signifikante Unterschiede für den Anteil CD 2 Rezeptor exprimierender, das Herzgewebe infiltrierender Zellen ergeben sich für den Zeitraum von Tag 18 bis zum 32. Tag.

3.1.2 EXPRESSION VON CD 3 REZEPTOREN

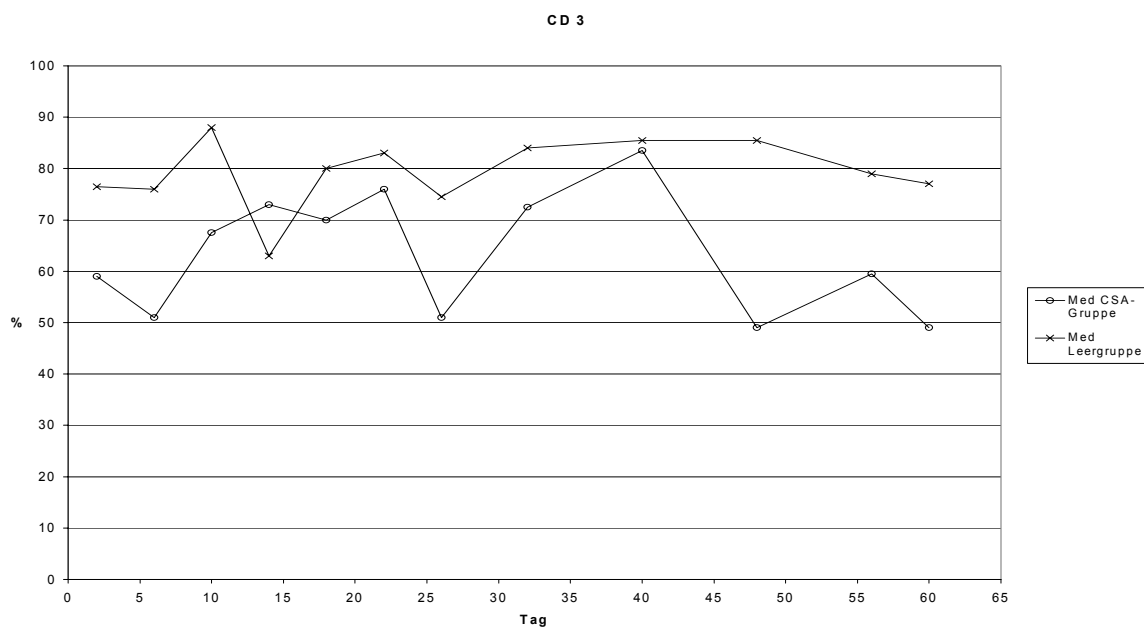


Abb.3.2: Grafische Darstellung des Anteils CD 3 Rezeptoren exprimierender Zellen im transplantierten Rattenherz. Vergleich einer unbehandelten sowie einer mit Cyclosporin A behandelten Gruppe.

Der Anteil der Leukozyten im Transplantat, die einen CD 3 Rezeptor exprimieren, nimmt zu Beginn der Untersuchung einen Anteil von 76,5 % für die Leergruppe sowie 59 % für die mit Cyclosporin A immunsupprimierte Gruppe ein. Dabei handelt es sich auch hier um Organe, die bis zu 48 Stunden nach Transplantation explantiert wurden.

Der CD 3 positive Anteil in der Leergruppe bewegt sich in dem Beobachtungszeitraum konstant um einen Mittelwert von 79.6 % bei einer Standardabweichung von 6,69 % (siehe Abb.3.2). Der höchste Wert der Leergruppe wurde bis zum 10. Tag mit einem Anteil von 88 % gemessen, der niedrigste Wert, ein Messintervall später, mit 63 % bis zum Tag 14.

Die Entwicklung des CD 3 positiven Anteils in der CSA behandelten Gruppe verläuft inhomogener (Standardabweichung: 11,38 %). Hier kommt es nach einem leichten Abfall von Tag 2 (59 %) bis Tag 6 (51 %) zu einem allmählichen Anstieg bis zum Tag 22 auf 76 %.

Nach einem Abfall bis zum 26. Tag auf 51 % steigt der Anteil CD 3 positiver Zellen bis zum 40. Tag auf den Höchstwert von 83,5 %. Wie in Abb. 3.2 zu erkennen ist, folgt von hier an ein Abfall bis zum Ende des Beobachtungszeitraums auf einen Anteil von 49 %, der in dieser Gruppe auch dem niedrigsten Wert entspricht.

Statistisch signifikante Unterschiede bei einem Vergleich der beiden Gruppen ergaben sich für die Werte vom 2. bis zum 10. Tag, vom 22. bis zum 26. Tag, sowie vom 48. bis zum 60. Tag.

3.1.3 EXPRESSION VON CD 4 REZEPTOREN

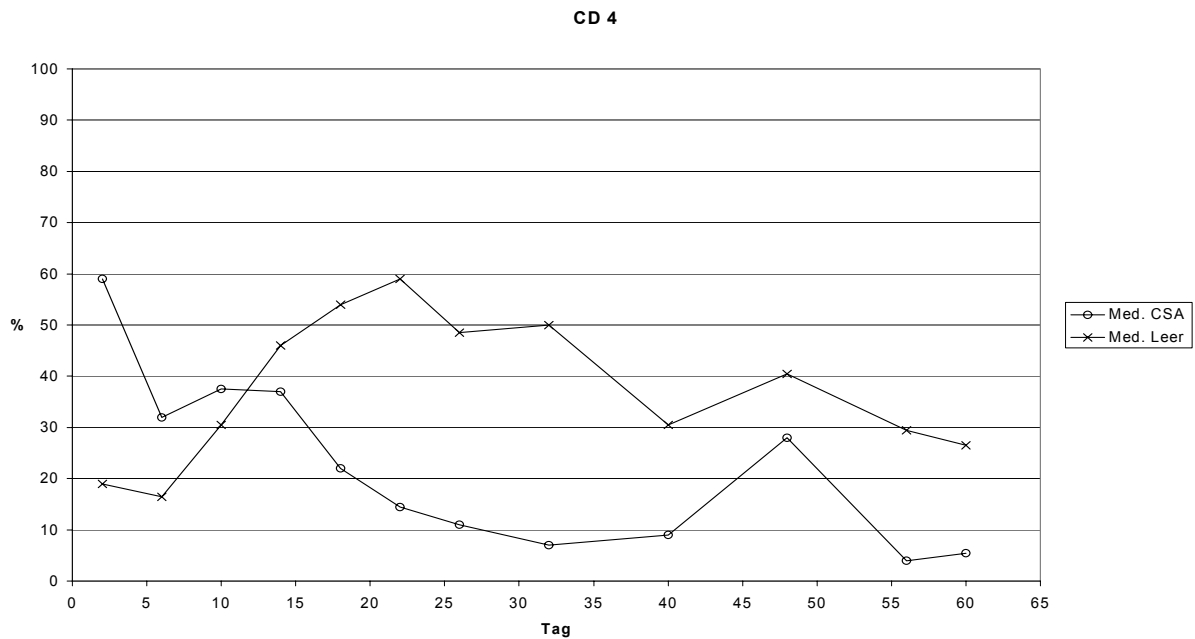


Abb.3.3: Grafische Darstellung des Anteils CD 4 Rezeptoren exprimierender Zellen im transplantierten Rattenherz. Vergleich einer unbehandelten sowie einer mit Cyclosporin A behandelten Gruppe.

Der Anteil der Zellen im Transplantat, die CD 4 exprimieren, nimmt zu Beginn des Beobachtungszeitraums 59 % bei der immunsupprimierten Gruppe ein, bei der unbehandelten Gruppe beträgt der Anteil 29 %. Hier kommt es, wie in Abbildung 3.3 zu erkennen ist, nach einem vorübergehenden Abfall auf 16,5 % bis zum 6. Tag, zu einem kontinuierlichen Anstieg der CD 4 positiven Zellen bis zum Höchstwert am 22. Tag von 59 %. Von da an nimmt der Anteil in der unbehandelten Gruppe auf 26 % ab. Lediglich bis Tag 48 steigt der Anteil markierter Zellen im Transplantat von 30,5 % (Tag 40) auf 40,5 %.

In der mit Cyclosporin A behandelten Gruppe fällt der bereits erwähnte Ausgangswert von 59% bis zum 6. Tag um fast die Hälfte auf 32 %. Ihm folgt ein Anstieg bis zum Tag 15 auf 37%. Von hier an nimmt der Anteil CD 4 exprimierender Zellen kontinuierlich ab (Tag 32: 11%). Jedoch steigt ihr Anteil auch in der behandelten Gruppe am 48. Tag noch einmal auf 28 %.

einen Wert von 28 %, bevor er dann, wie in Abbildung 3.3 zu sehen ist, bis zum Ende des Beobachtungszeitraums auf 5,5 % abfällt. Der Anteil CD 4 positiver Zellen wird zu Beginn der Untersuchung am Tag 2 gemessen, der niedrigste Wert am Tag 56 mit einem Anteil von 4%.

Statistisch signifikante Unterschiede ergeben sich bei den Ergebnissen der beiden Gruppen für die ersten beiden Messintervalle an Tag 2 und 6 sowie im Zeitraum des 18. bis 40. Tag.

3.1.4 EXPRESSION VON CD 5 REZEPTOREN

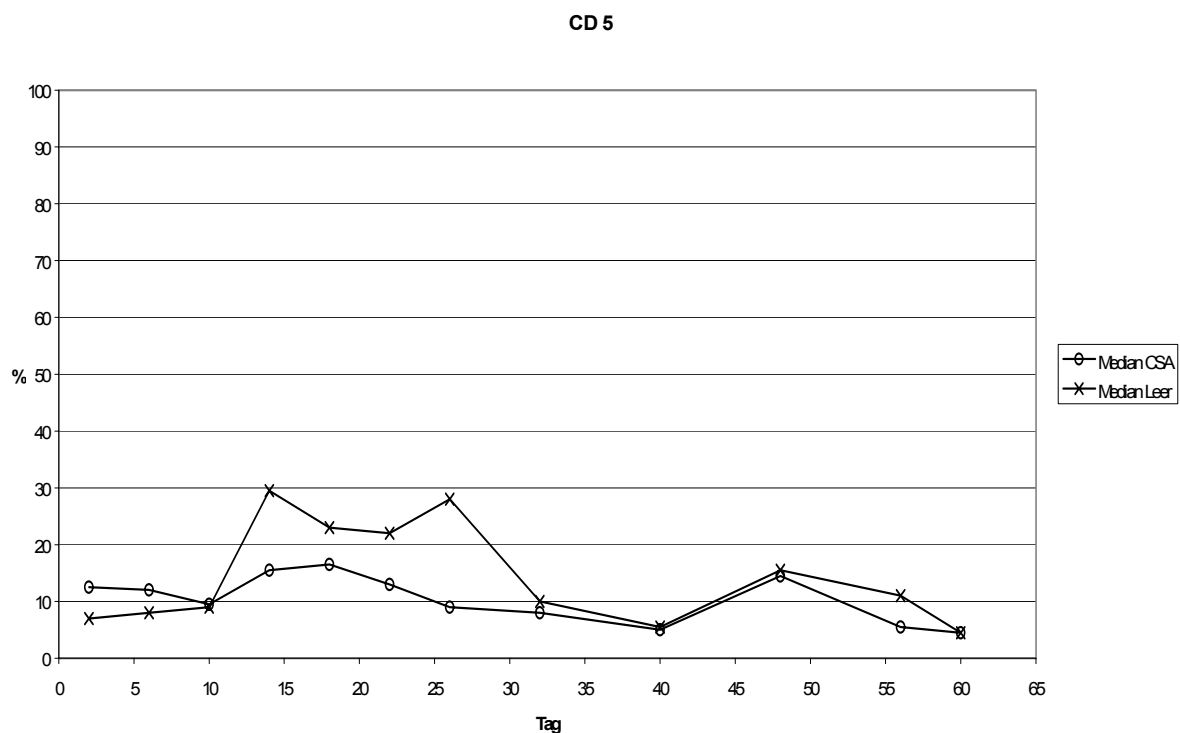


Abb.3.4: Grafische Darstellung des Anteils CD 5 Rezeptoren exprimierender Zellen im transplantierten Rattenherz. Vergleich einer unbehandelten sowie einer mit Cyclosporin A behandelten Gruppe

Der Anteil der Zellen im , die CD 5 exprimieren, nimmt zu Beginn des Untersuchungszeitraums für die Leergruppe einen Anteil von 7% ein. Bei der Cyclosporin A behandelten Gruppe sind es 12,5%.

In der unbehandelten Gruppe steigt dieser Anteil bis zum 10. Tag auf 9%, dann in den nächsten 4 Tagen um das dreifache auf 29,5%. Zwischen dem 14. und dem 26. Tag bleibt der Anteil der Zellen, die den CD 5 Rezeptor exprimieren, auf über 20%. Erst in Folge fällt dieser Anteil, wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist, bis zum 32. Tag auf 10%. Zwischen dem 40. Tag (5,5%) und dem Ende (4,5%) des Untersuchungszeitraums kommt es noch einmal zu einem leichteren Anstieg bis zum 48. Tag (15,5%) und Tag 56 (11%).

Die Transplantate der immunsupprimierten Gruppe wiesen im Gesamtverlauf eine ähnliche Entwicklung des CD positiven Zellanteils auf. Lediglich der Anstieg in der Leergruppe zwischen dem 14. und 26. Tag war weniger stark ausgeprägt. In diesem Zeitraum lag auch der höchste Wert mit 16,5%. Der niedrigste Wert wurde am Ende des Untersuchungszeitraums mit 4,5% am Tag 60 gemessen.

Statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich beider Gruppen bestanden lediglich für den Tag 26.

3.1.5 EXPRESSION VON CD 8 REZEPTOREN

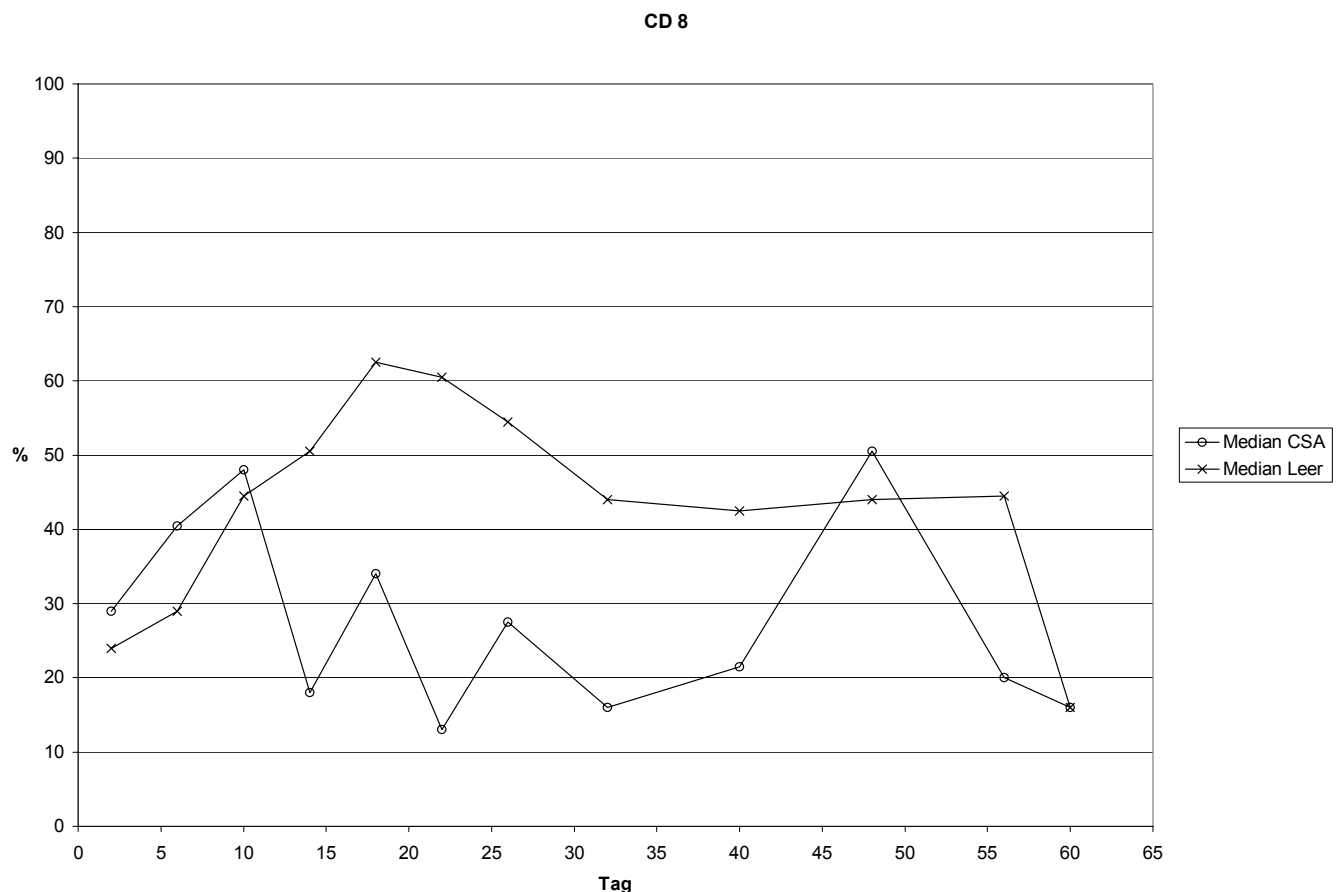


Abb.3.5: Grafische Darstellung des Anteils CD 8 Rezeptoren exprimierender Zellen im transplantierten Rattenherz. Vergleich einer unbehandelten sowie einer mit Cyclosporin A behandelten Gruppe.

Der Anteil an Leukozyten im Transplantat, welche CD 8 Rezeptoren exprimieren, nimmt zu Beginn bei der unbehandelten Versuchsgruppe einen Wert von 24%, bei der mit Cyclosporin A immunsupprimierten Gruppe einen Wert von 29% ein.

In der Leergruppe kommt es, wie in Abbildung 3.5 zu sehen ist, kontinuierlichen Anstieg bis zum 18. Tag auf 62,5% (Höchstwert). Darauf folgt ein allmählicher Abfall des Anteils CD 8

positiver Zellen auf 44% bis zum Tag 32. Auf diesem Niveau persistiert der Wert nun bis zum 56. Tag, worauf ein erneuter Abfall auf 16% bis zum 60. Tag folgt.

Die Entwicklung des CD 8 exprimierenden Anteils in der CSA behandelten Gruppe verläuft insgesamt inhomogen. Vom Beginn der Untersuchung an kommt es ebenfalls zu einem vorübergehenden Anstieg auf 48% bis zum 10. Tag. Hierauf folgt ein Abfall im nächsten Messintervall auf 18% (Tag 14) sowie daraufhin erneut zu einem Anstieg auf 34%. Dieser sägezahnartige Verlauf setzt sich bis zum Ende des Untersuchungszeitraums weiter fort, wobei ein Anstieg am 48. Tag auf 50,5% (Höchstwert) besonders auffällt. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraums kommt es jetzt erneut zu einem Abfall des Anteils Anti-CD 8 markierter Zellen auf 16%.

Statistisch signifikante Abweichung wurden im Verlauf der Untersuchung für den Zeitraum vom 14. Bis zum 40. Tag sowie am 56. Tag ermittelt.

3.1.6 EXPRESSION VON CD 11a REZEPTOREN

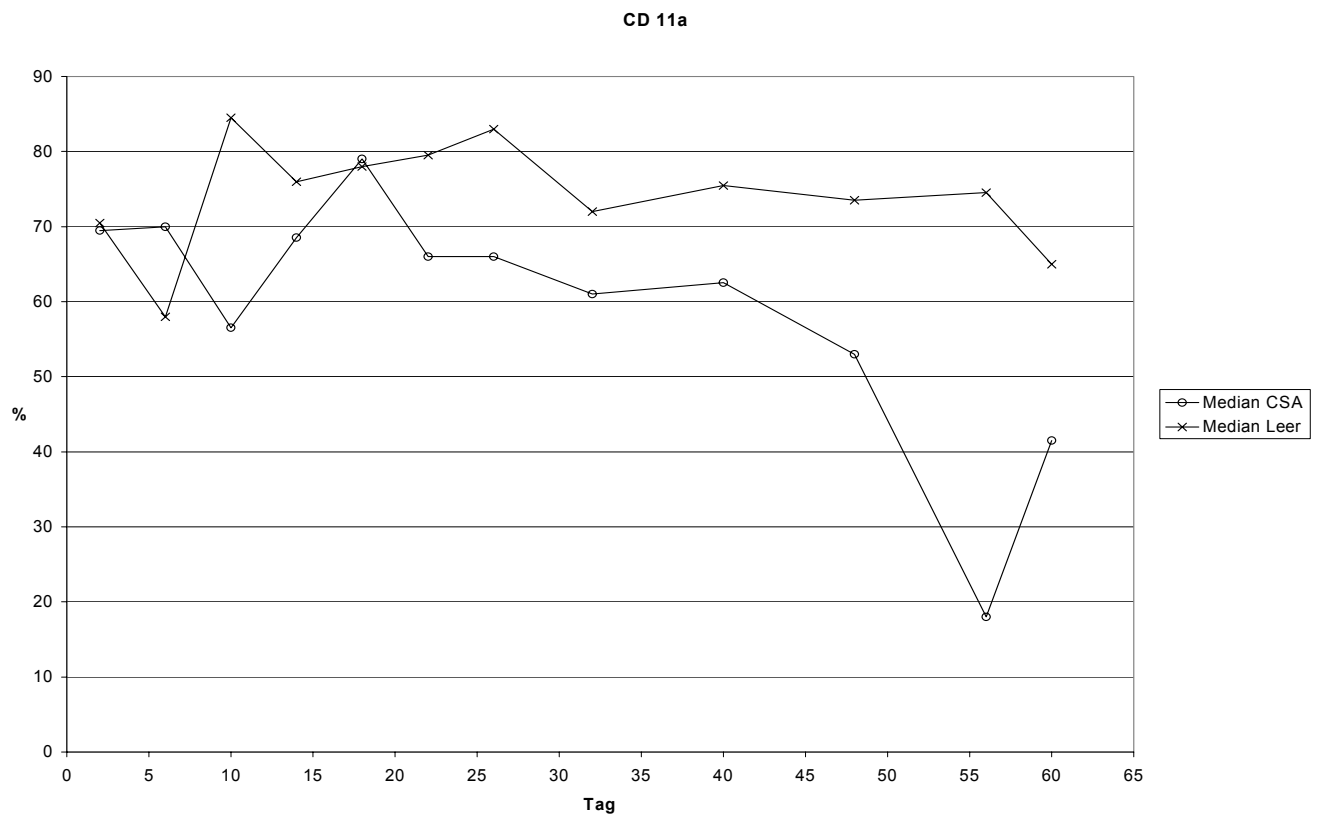


Abb.3.6: Grafische Darstellung des Anteils CD 11a Rezeptoren exprimierender Zellen im transplantierten Rattenherz. Vergleich einer unbehandelten sowie einer mit Cyclosporin A behandelten Gruppe.

Der Anteil an Zellen im Transplantat, die einen CD 11a Rezeptor exprimieren, nimmt zu Beginn des Untersuchungszeitraums einen Wert von 70,5 % für die unbehandelte Gruppe sowie von 69,5 % für die mit Cyclosporin A immunsupprimierte Gruppe ein.

In der Leergruppe fällt der Ausgangswert bis zum 6.Tag auf 58 % ab, um dann bis zum 10. Tag auf 84,5 % (Höchstwert) anzusteigen. Im weiteren Verlauf persistiert der Anteil CD 11a positiver Zellen im Bereich zwischen 70% und 80%. Ausnahmen bilden hier ein erneuter

kurzer Anstieg auf 83% bis zum 26. Tag, sowie ein Abfall auf 65% (Tiefstwert) bis zum Ende des Untersuchungszeitraums.

Wie in Abbildung 3.6 zu sehen, ist der Anteil CD 11a exprimierender Zellen in der CSA behandelten Gruppe bis zum 6. Tag nahe zu unverändert bei 70%. Bis zum 10. Tag folgt ein Abfall um dann bis zum Tag 18 auf einen Höchstwert von 79% anzusteigen. Von 18. Tag an findet ein allmählicher Abfall CD 11a positiver Zellen statt (bis Tag 48 auf 53%). Bis zum 56. Tag kommt es jetzt zu einem rapiden Abfall auf unter 20%, jedoch bis zum Ablauf des Beobachtungszeitraums erneut zu einem Anstieg auf 41,5%.

Statistisch signifikante Unterschiede werden bei einem Vergleich der immunsupprimierten Gruppe mit der unbehandelten Gruppe für den 26. Tag sowie für die letzten 3 Messintervalle beobachtet.

3.1.7 EXPRESSION VON CD 11b REZEPTOREN

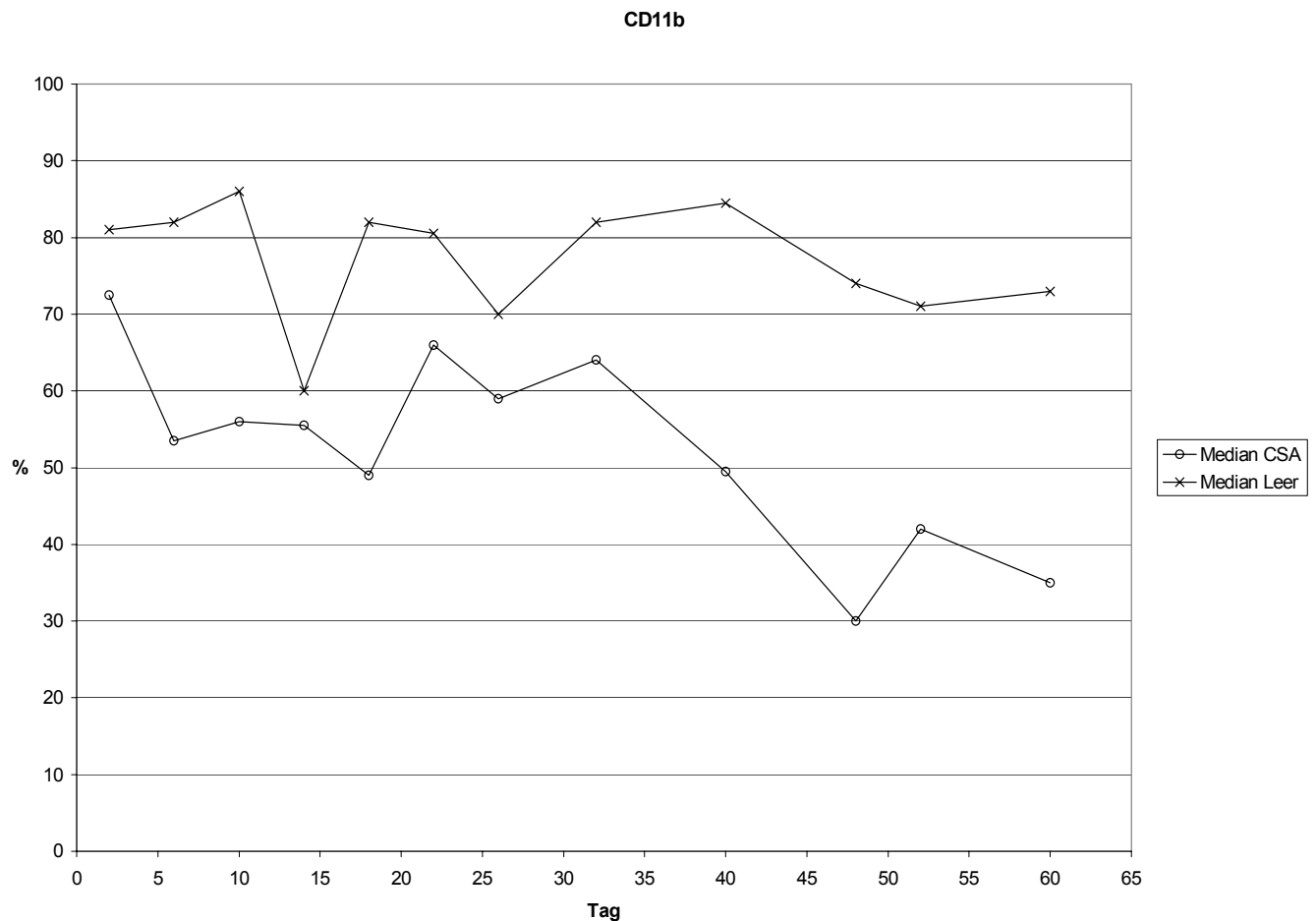


Abb.3.7: Grafische Darstellung des Anteils CD 11b Rezeptoren exprimierender Zellen im transplantierten Rattenherz. Vergleich einer unbehandelten sowie einer mit Cyclosporin A behandelten Gruppe.

Der Anteil an Zellen im Transplantat, die einen CD 11b Rezeptor exprimieren, nimmt zu Beginn des Untersuchungszeitraums für die unbehandelte Gruppe einen Wert von 81% ein, während 72,5% der Zellen im Transplantat der mit Cyclosporin A behandelten Tiere Anti-CD 11b binden.

In der Leergruppe kommt es - nach einem Anstieg bis zum 10. Tag auf 86% (Höchstwert) - zu einem vorübergehenden Abfall bis zum Tag 14 auf 60%. Im weiteren Verlauf persistiert der Anteil CD 11b positiver Zellen zwischen 70 % am 26. Tag und 84,5 % am 40. Tag. Gegen Ende des Beobachtungszeitraums kommt es noch einmal zu einem leichten Abfall auf 71% (Tag 52) beziehungsweise 60% bis zum 60. Tag.

In der CSA behandelten Versuchstiergruppe kommt es im ersten Beobachtungsintervall zu einem deutlichen Abfall der CD 11b positiven Zellen von initial 72,5% auf 53,5% (bis Tag 6). Im weiteren Verlauf kommt es bis zum Tag 18 zu einem leichten Abfall (49 %) gefolgt von einem Anstieg auf 66% bis Tag 22. Erst ab dem 32. Tag kommt es, wie in Abbildung 3.7 zu sehen, zu einem Abfall auf unter 50 % des Ausgangswertes (Tag 48: 30%). Dieses niedrige Anteilsniveau wird bis zum Ablauf des Versuchszeitraums gehalten (Tag 60: 35%).

Statistisch signifikante Abweichungen werden beim Vergleich der unbehandelten Gruppe mit der immunsupprimierten Gruppe an den Tagen 6-10 sowie 18-22 beobachtet. Insbesondere das letzte Drittel des Beobachtungszeitraums (Tag 40-60) fällt durch eine signifikante Abweichung beider Verläufe auf.

3.1.8 EXPRESSION VON CD 18 REZEPTOREN

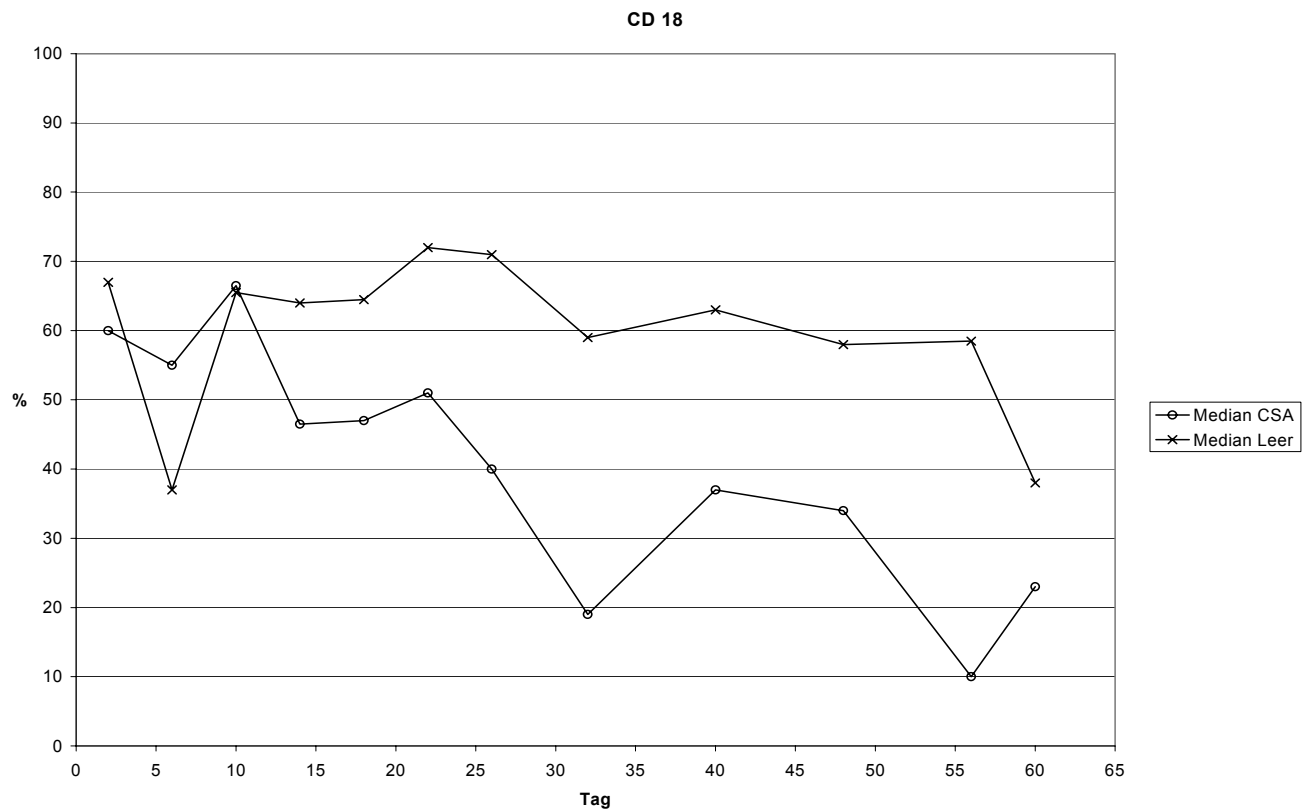


Abb.3.8: Grafische Darstellung des Anteils CD 18 Rezeptoren exprimierender Zellen im transplantierten Rattenherz. Vergleich einer unbehandelten sowie einer mit Cyclosporin A behandelten Gruppe.

Der Anteil an Zellen im Transplantat, die einen CD 18 Rezeptor exprimieren, nimmt zu Beginn des Beobachtungszeitraums einen Wert von 67% in der Leergruppe sowie 60% in der mit Cyclosporin A immunsupprimierten Gruppe ein.

In der unbehandelten Gruppe kommt es bis zum 5. Tag nach der Transplantation zu einem Abfall der CD 18 positiven Zellen auf 37%. Ihm folgt bis zum 10. Tag ein ebenso steiler Anstieg bei dem mit 65,5% der Ausgangswert (67%) fast wieder erreicht wird. Auf dem Niveau zwischen 70% und 60% (Höchstwert am 20. Tag mit 72%) bleibt der Anteil Anti-

CD18 bindender Zellen bis zum 56. Tag jedoch mit fallendem Trend. Erst im letzten Messintervall fällt sein Wert bis auf 38% (Tag 60).

Auch in der CSA behandelten Gruppe fällt der CD 18 positive Anteil initial auf 55% , dies ist jedoch nicht annähernd so stark wie in der unbehandelten Vergleichsgruppe. Ein erneuter Anstieg bis zum Tag10 auf 66,5% wird gefolgt von einem deutlichen Abwärtstrend (bis Tag 32 auf 19%). Bis zum 40. Tag kommt es zu einem erneuten Anstieg auf 37% CD 18 exprimierender Zellen. Erst im vorletzten Messintervall fällt ihr Anteil auf nur noch 10% der analysierten Zellen. Bis um Ende des Beobachtungszeitraums kommt es noch einmal zu einem leichten Anstieg auf 23%.

Statistisch signifikante Abweichungen der Meßwerte in der immunsupprimierten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Gruppe werden am 6. Tag sowie in den Zeiträumen vom 26. bis zum 32. Tag und zwischen dem 48. und 56. Tag erkannt.

3.1.9 EXPRESSION VON CD 25 REZEPTOREN

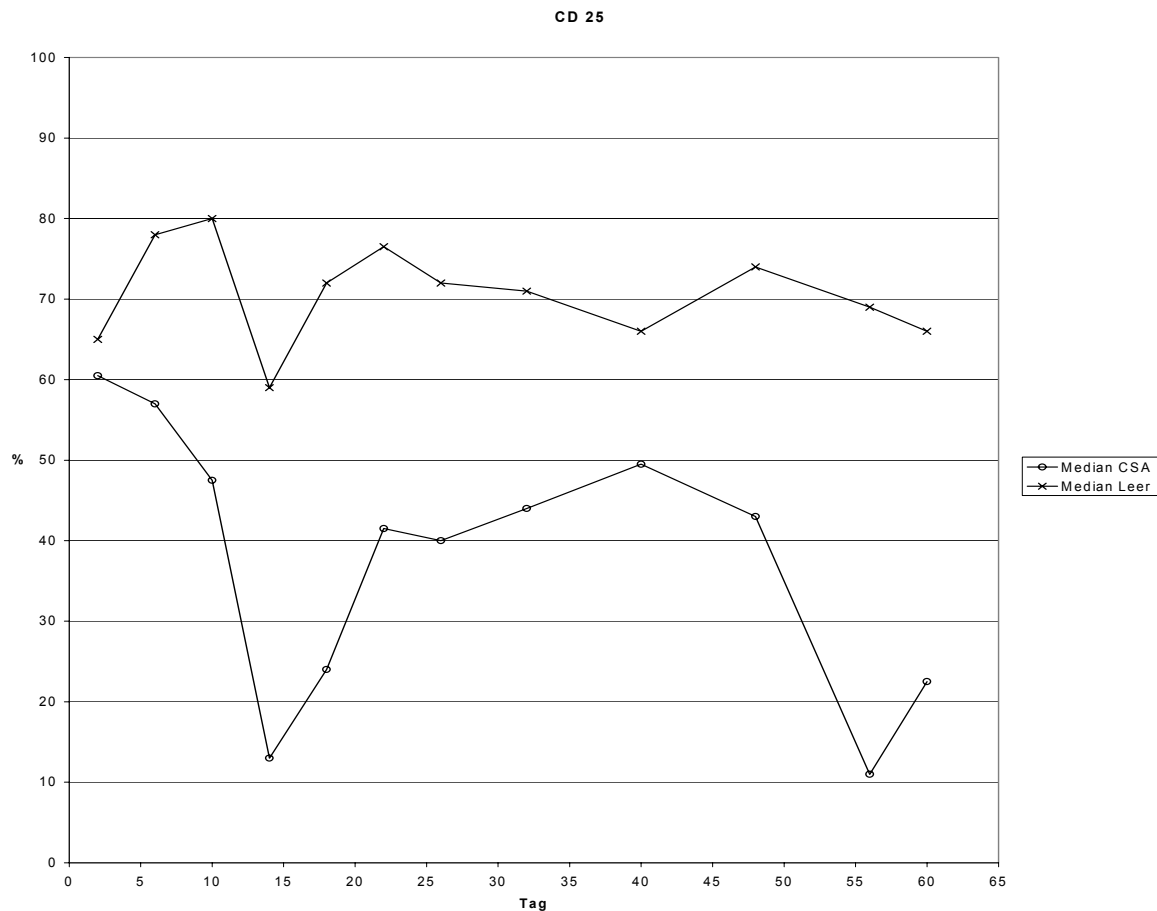


Abb.3.9: Grafische Darstellung des Anteils CD 25 Rezeptoren exprimierender Zellen im transplantierten Rattenherz. Vergleich einer unbehandelten sowie einer mit Cyclosporin A behandelten Gruppe.

Der Anteil an Zellen im Transplantat, die einen CD 25 Rezeptor exprimieren, nimmt zu Beginn des Untersuchungszeitraums in der unbehandelten Gruppe einen Wert von 65% ein, während 60,5% der Zellen im Transplantat der mit Cyclosporin A immunsupprimierten Gruppe Anti-CD 25 binden.

In den ersten zwei Beobachtungsintervallen steigt der CD 25 positive Anteil in der Leergruppe auf 80% (Höchstwert) am Tag 10 an. Bis zum 14. Tag folgt jetzt ein Abfall auf den niedrigsten Wert im Beobachtungszeitraum (59 %). Hierauf kommt es zu einem erneuten Anstieg auf 76,5 % bis zum 22. Tag. Im weiteren Verlauf liegt der Anteil CD 25

exprimierender Zellen bis zum Ende des Untersuchungszeitraums bei ca. 70%. Die Standardabweichung in den letzten 40 Tagen liegt bei 2.98%.

In der mit CSA immunsupprimierten Gruppe fällt der Anteil Anti-CD 25 bindender Zellen, wie in Abbildung 3.9 zu sehen, in den ersten 14 Tagen auf 13% ab. In der folgenden Zeit kommt es zu einem erneuten Anstieg, der am Tag 40 seinen Höhepunkt mit 49,5% erreicht hat. Im Anschluß daran findet ein erneuter Abfall CD 25 exprimierender Zellen statt. Bis zum 56. Tag wird der niedrigste Wert im gesamten Beobachtungszeitraum mit 11% gemessen. Im letzten Untersuchungsintervall kommt es noch einmal zu einem Anstieg auf 22,5% bis zum 60. Tag.

Statistisch signifikante Abweichung von den CD 25 Anteilsverläufen werden in den Zeiträumen vom 10. bis zum 22. Tag, sowie vom 48. Tag bis zum Ende des Versuchszeitraums (Tag 60) beobachtet.

3.1.10 EXPRESSION VON CD 45RA REZEPTOREN

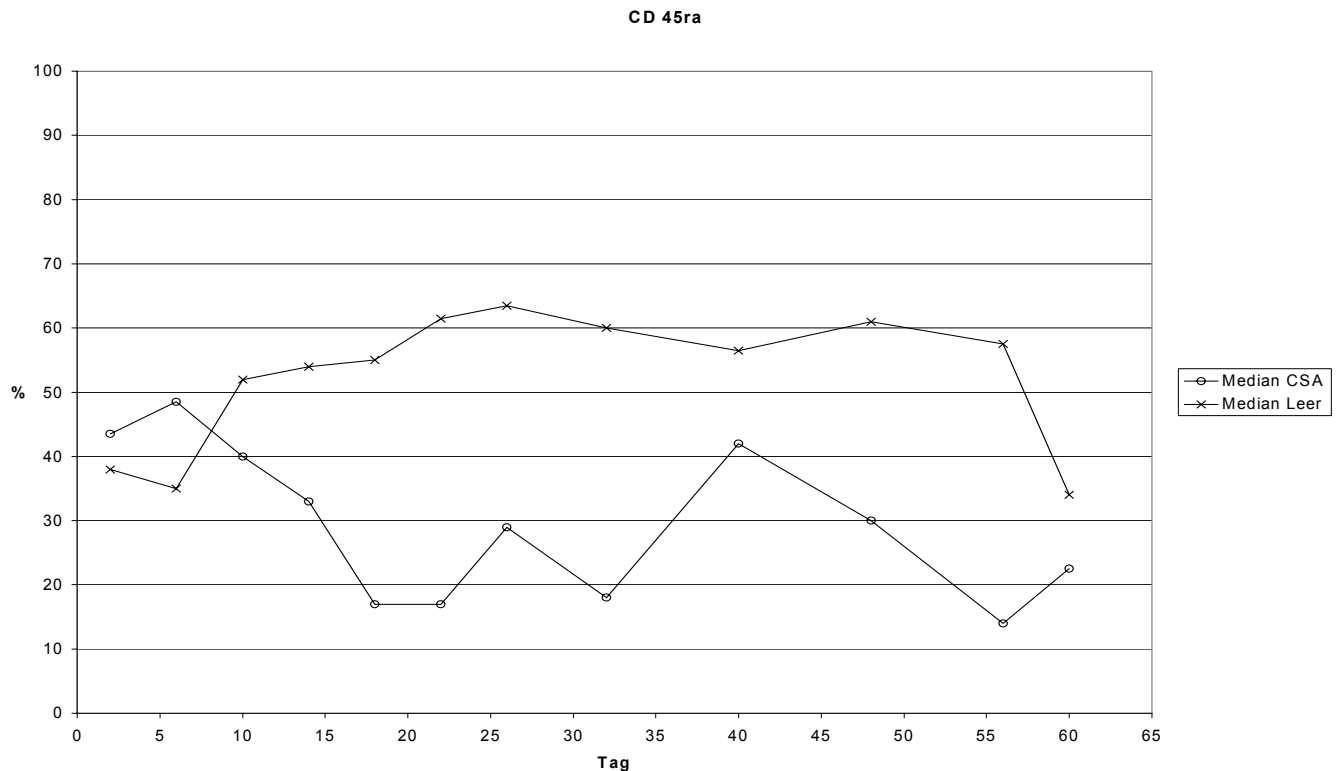


Abb. 3.10: Grafische Darstellung des Anteils CD 45_{RA} Rezeptoren exprimierender Zellen im transplantierten Rattenherz. Vergleich einer unbehandelten sowie einer mit Cyclosporin A behandelten Gruppe.

Der Anteil an Zellen im Transplantat, die einen CD 45RA Rezeptor exprimieren, nimmt zu Beginn der Untersuchung einen Anteil von 38% für die unbehandelte Gruppe, sowie 43,5% für die mit Cyclosporin A behandelte Gruppe ein.

In der Leergruppe kommt es ab dem 6. Tag (35%), zu einem steilen Anstieg bis zum Tag 10 Auf 52%. Im weiteren Verlauf steigt der Anteil CD 45RA positiver Zellen bis zum 26. Tag auf 63,5% (Höchstwert). Dieses Niveau wird mit leichten Abweichungen bis zum 56. Tag

gehalten. Erst im letzten Beobachtungsintervall fällt der Anteil CD 45RA exprimierender Zellen auf einen Wert von 34%.

In der CSA behandelten Gruppe nimmt der Anteil an Zellen, die Anti-CD 45RA binden, bis zum 18. Tag auf 17 % ab. Der weitere Verlauf ist, wie in Abbildung 3.10 zu sehen, ohne klaren Trend. Einem Anstieg bis zum 26. Tag (29 %) folgt ein Abfall sowie ein erneuter Anstieg bis zum 40. Tag auf 42 %. In den darauffolgenden 16 Tagen kommt es wieder zu einem Abfall der CD 45RA exprimierenden Zellen auf 14% (Tag 56). Im letzten Messintervall steigt dieser Anteil nochmals auf 22,5 %.

Statistisch signifikante Abweichungen im Verlauf der Entwicklung des Anteils an Zellen im Transplantat, die einen CD 45RA Rezeptor exprimieren, beobachtet man für den Zeitraum zwischen dem 18. und 32. Tag. Auch für den 56. Tag fällt eine signifikante Abweichung auf.

3.1.11 EXPRESSION VON CD 49d REZEPTOREN

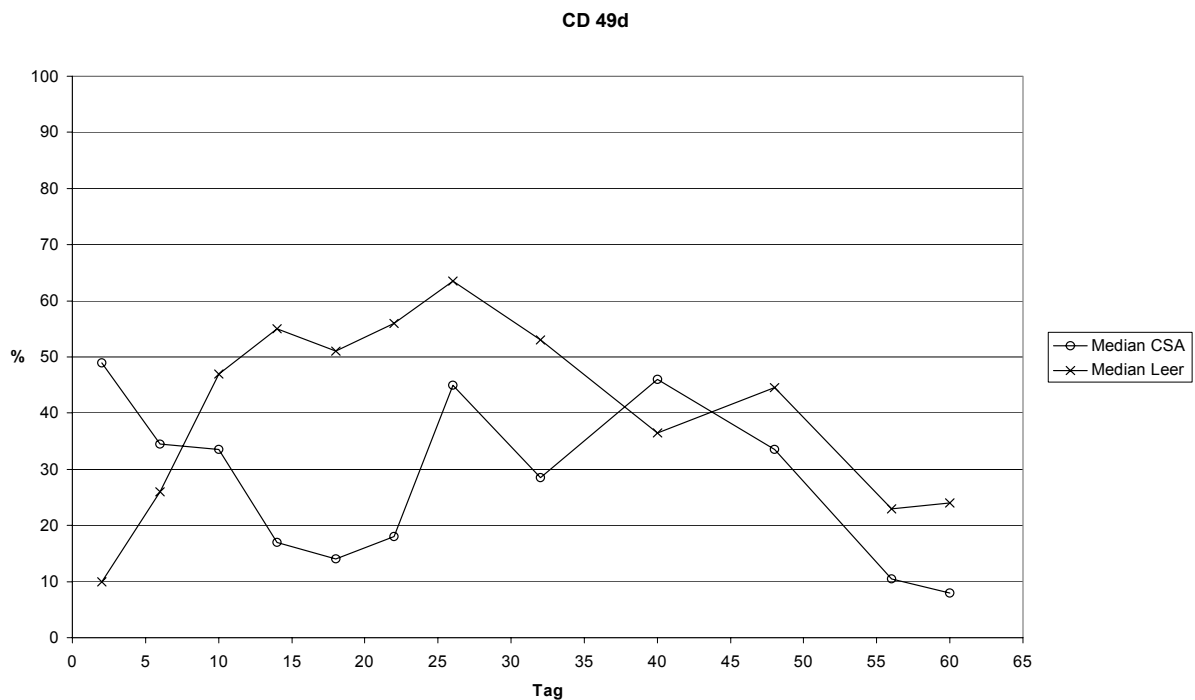


Abb. 3.11: Grafische Darstellung des Anteils CD 49d Rezeptoren exprimierender Zellen im transplantierten Rattenherz. Vergleich einer unbehandelten sowie einer mit Cyclosporin A behandelten Gruppe.

Der Anteil an Zellen im Transplantat, die einen CD 49d Rezeptor exprimieren, nimmt zu Beginn des Beobachtungszeitraums für die unbehandelte Gruppe einen Wert von 10% ein, während abweichend dazu 49% aller Zellen im Transplantat der Cyclosporin A behandelten Gruppe bis zum 2. Tag Anti-CD 49d binden.

In der Leergruppe steigt der Ausgangswert von 10% bis zum 14. Tag um mehr als das fünffache auf 55% an. Nach einem leichten Abfall bis zum 18. Tag auf 51% setzt sich der Anstieg bis zum 26.Tag auf 63,5% (Höchstwert) fort. Hierauf folgt ein Abfall des Anteils CD 49d positiver Zellen, unterbrochen durch einen leichten Anstieg zwischen dem 39. und dem 48. Tag, bis auf 23% am 56.Tag (24% am Tag 60).

In der CSA behandelten Gruppe wird bereits am 2. Tag ein Anteil CD 49d exprimierender Zellen von 49% (Höchstwert) gemessen. Dieser, im Vergleich zur Leergruppe fast fünffache Wert fällt jedoch, wie in Abbildung 3.11 zu sehen, im Laufe der nächsten 16 Tage auf einen Anteil von nur noch 14%. Bis zum 26. Tag kommt es zu einem Anstieg der CD 49d positiven Zellen im Transplantat auf 45%. Ein ähnlich hoher Wert wird am 40. Tag gemessen (46%), wobei zwischendurch ein Abfall bis zum 32. Tag auf 28,5% beobachtet werden kann. In den letzten drei Messintervallen fällt der Anteil Anti-CD 49d bindender Zellen kontinuierlich auf einen Endwert am Tag 60 von 8% (niedrigster Wert).

Statistisch signifikante Abweichungen im Vergleich beider Gruppen ergeben sich für den Beginn des Untersuchungszeitraums am 2. Tag sowie für den Zeitraum vom 14. bis zum 32. Tag.

3.1.12 EXPRESSION VON CD 71 REZEPTOREN

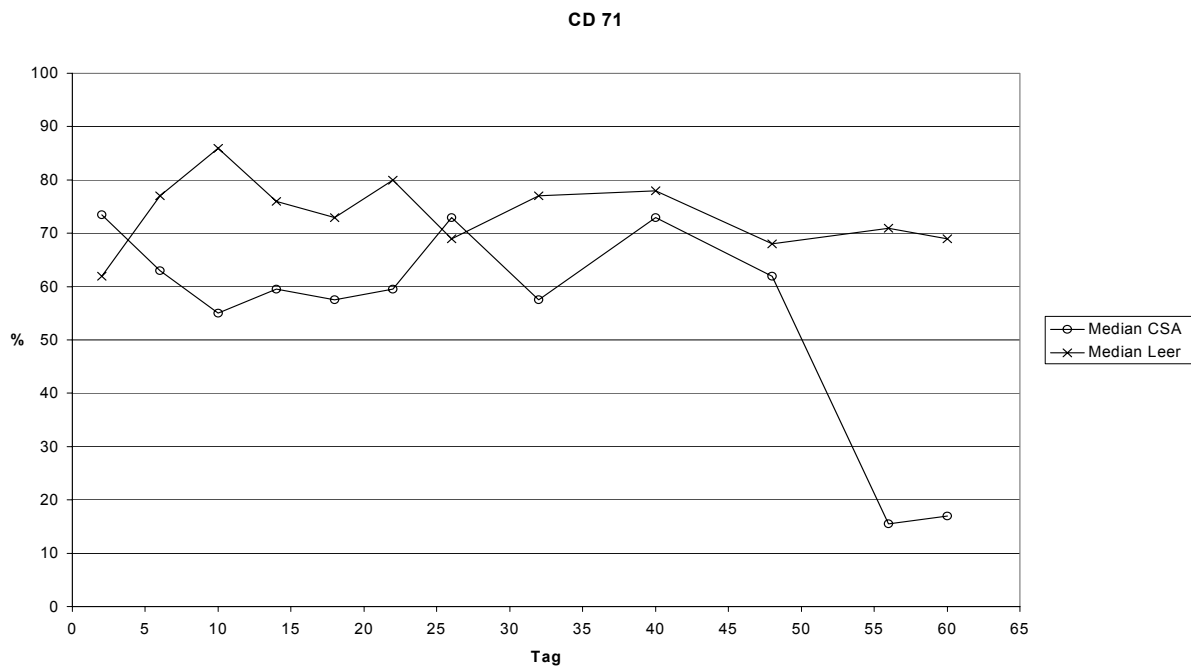


Abb. 3.12: Grafische Darstellung des Anteils CD 71 Rezeptoren exprimierender Zellen im transplantierten Rattenherz. Vergleich einer unbehandelten sowie einer mit Cyclosporin A behandelten Gruppe.

Der Anteil an Zellen im Transplantat die einen CD 71 Rezeptor exprimieren, nimmt zu Beginn des Beobachtungszeitraums einen Wert von 62% für die unbehandelte Gruppe ein, während in der mit Cyclosporin A behandelten Gruppe 73,5% der Zellen Anti-CD 71 binden. In der Leergruppe kommt es bis zum 10. Tag zu einem deutlichen Anstieg dieses Anteils bis auf 86% (Höchstwert). Im weiteren Verlauf bewegt sich der Anteil CD 71 positiver Zellen zwischen 80% (Tag 22) und 68% (Tag 48, niedrigster Wert) mit leicht sinkender Tendenz. Der Anteil am Ende des Beobachtungszeitraumes liegt bei 69%.

In der CSA behandelten Gruppe liegt der Anfangswert mit 73,5% über dem der Leergruppe. Hier kommt es initial zu einem Abfall in den ersten zwei Beobachtungsintervallen auf 55% bis zum 10. Tag. Im weiteren Verlauf schwankt der Anteil CD 71 exprimierender Zellen, wie

in Abbildung 3.12 zu sehen, bis zum 48. Tag zwischen 73% (Tag 22) und 57,5% (Tag 32). Ab Tag 48 fällt der Anteil der Zellen im Transplantat, die Anti-CD 71 binden, auf ein Niveau von 15,5%. Dieser niedrige Wert bleibt auch bis zum Ende des Untersuchungszeitraums unverändert (17% am 60. Tag).

Statistisch signifikante Abweichungen in der Verlaufsbeobachtung beider Gruppen erkennt man nur im letzten Messintervall zwischen Tag 56 und Tag 60.

4. DISKUSSION

4.1 Zur Wirkung von Cyclosporin A

4.1.1 CYCLOSPORIN A IST EIN HEMMER DER INTERLEUKIN 2 PRODUKTION

Mitte der siebziger Jahre wurden bei der Suche nach antibiotisch wirksamen Substanzen die Cyclosporine entdeckt [20]. Cyclosporin ist ein zyklisches Undecapeptid (Abb.: 4.1) aus *Tolypocladium Inflatum* GAMS (Fungi imperfecti) [21], dessen ursprünglicher Fundort die Hardangervidda-Hochebene in Süd-Norwegen ist.

Cyclosporin (Sandimmun®) wurde 1983 zur Prophylaxe der Transplantatabstoßung nach Organ- und Knochenmarkstransplantation und zur Therapie der Graft-versus-Host-Krankheit eingeführt.

Cyclosporin A vermindert die Interleukin 2 (IL-2)-Freisetzung aus T-Helferzellen und indirekt die IL-1-Freisetzung aus Makrophagen [22, 23]; in höheren Konzentrationen wird auch die Expression des IL-2-Rezeptors unterdrückt [24]. Insgesamt wird die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen durch T-Helferzellen unterbunden, wobei die Aktivierung von T-Suppressorzellen nur gering beeinflusst wird [25, 26]. Erst nach Einführung von Cyclosporin in die Therapie konnte ein intrazelluläres Protein charakterisiert werden, das die Substanz spezifisch bindet [27]. Dieses Cyclosporin-Bindungsprotein bezeichnete man als *Cyclophilin*. Cyclophiline sind Enzyme, die die Cis/Trans-Umlagerung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen katalysieren und die deshalb auch als *Rotamasen* bezeichnet werden. Cyclosporin hemmt die Rotamasen-Aktivität der Cyclophiline [28], so dass eine Verbindung zum Wirkungsmechanismus bestehen könnte. Wie verschiedene Untersuchungen zeigen konnten, reicht die Hemmung der Rotamase-Aktivität allein jedoch nicht aus, um eine immunsuppressive Wirkung zu erzeugen. Hingegen bindet der Arzneistoff-Enzym-Komplex an ein weiteres Enzym, *Calcineurin*. Calcineurin (Phosphatase 2B) ist eine

Calcium/Calmodulin-abhängige Serin-Threonin-Phosphatase. Das heterodimere Molekül besteht aus einer katalytischen Untereinheit von 59 kDa und aus einer regulatorischen Untereinheit von 19 kDa. Der katalytische Teil, CNA, trägt die Calmodulin-bindende und eine autoinhibitorische Domäne, während der regulatorische Teil, CNB, Calcium bindet. Der Cyclosporin-Cyclophilin-Komplex koppelt an beide Untereinheiten [29] und hemmt die Phosphatase-Aktivität. Ungehemmt phosphoryliert Calcineurin unter anderem die zytosolische Untereinheit eines Zellkernfaktors in aktivierten T-Zellen (NF-Atc). Die dephosphorilierte Untereinheit gelangt in den Zellkern und aktiviert dort in Kombination mit seiner nukleären Untereinheit (NF-ATn) die Transkription des Interleukin-2-Gens. Nach schneller Translation wird das IL-2-Protein von der T-Zelle als Signal abgegeben. Genauere Untersuchungen zeigen, dass durch die Calcineurin vermittelte Dephosphorylierung zusätzlicher Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und Oct/OAP die Transkription des IL-2-Gens insgesamt gesteigert wird. Calcineurin ist auch an der Aktivierung von cAMP-abhängigen Genen beteiligt [30, 31]. Phosphatase-1- und cAMP-abhängige Kinasen sind Calcineurin-Substrate [32, 33], und auch die NO-Synthase wird durch Calcineurin dephosphoryliert und aktiviert [34,35,36].

Die immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin wird also dadurch vermittelt, dass die Substanz an ein Cyclophilin bindet; der Cyclosporin-Cyclophilin-Komplex hemmt die Phosphatase Calcineurin, so dass nachfolgend die calciumabhängige Aktivierung der Interleukin-Gene unterbrochen ist. Außerdem erhöht Cyclosporin die Expression von TGF- β (Transforming growth factor beta), der die durch IL-2 stimulierte T-Zell-Proliferation und die Generation zytotoxischer T-Lymphozyten hemmt [37].

4.2 Zur Rolle von Interleukin-2 bei der Abstoßung transplanterter Organe

4.2.1 INTERLEUKIN-2 STEUERT DIE T-ZELL-ANTWORT BEI DER ORGANABSTOßUNG

IL-2 ist ein Protein, das zur Gruppe der Cytokine gerechnet wird. Dabei erfolgt die Bildung durch aktivierte T-Zellen, die selbst auch Angriffsort sind.

Eine ruhende T-Zelle, die mit einem adäquaten Antigen in Gegenwart des erforderlichen costimulierende Signals in Kontakt getreten ist, und dazu zählen die fremden MHC-Moleküle, tritt in die G1-Phase des Zellzyklus ein und beginnt IL-2 zusammen mit der α -Kette des IL-2-Rezeptors zu synthetisieren [38]. Diese α -Kette, die die Affinität des IL-2-Rezeptors zu Interleukin-2 sehr stark erhöht, verbindet sich mit der β - und γ -Kette, die im Ruhezustand der T-Zelle den IL-2 Rezeptor bilden. Die Bindung von Interleukin-2 führt dazu, dass die Zellen den Rest des Zellzyklus durchlaufen und sich in der darauf folgenden Zeit mehrfach am Tag teilen. IL-2 fördert auch die Differenzierung dieser Zellen zu T-Effektorzellen [39].

4.3 Zur Expression von leukozytenspezifischen Antigenen im Herzgewebe transplanterter Ratten ohne Behandlung sowie unter Immunsuppression mit Cyclosporin A

4.3.1 EXPRESSION VON CD 2 REZEPTOREN

Bei CD 2 (LFA-2) handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül welches der Gruppe der Immunglobulinsuperfamilie zugeordnet wird. LFA-2 wird auf T-Zellen, Thymocyten sowie natürlichen Killerzellen exprimiert. Ligand von LFA-2 ist LFA-3 (CD 58 [Homolog des murinen CD 48 Rezeptors]), dass auf Lymphocyten und Antigen präsentierenden Zellen exprimiert wird. Die Bindung von LFA-2 und LFA-3 gibt der T-Zelle die Möglichkeit länger und intensiver mit der Antigen präsentierenden Zelle in Kontakt zu treten. Die Expression von LFA-2 an der Oberfläche nimmt nach Aktivierung der T-Zelle um den Faktor 2-4 zu [40].

Der von uns verwandte Antikörper stammte von der Firma Pharmingen (10975 Torreyana Road, San Diego, USA). Es handelte sich um einen FITC markierten Maus-anti-Ratte Antikörper [41,42] des Isotyps Maus IgG_{2a}, κ (Klon OX-34).

In der von uns untersuchten Gruppe unbehandelter Tiere kommt es zwischen dem 6. und 9. Tag post transplantationem zu einem deutlichen Anstieg an Zellen, die einen CD 2 Rezeptor exprimieren. Dies entspricht der T-Zell Antwort, wie sie bei Abstoßungen nicht MHC-kompatibler Organe beobachtet wird [43]. Dieser Anstieg um das Fünffache des Ausgangswertes hält bis zum 32. Tag an. Von hier an fällt der CD 2 positive Anteil wieder bis auf den Ausgangswert. In der Cyclosporin A behandelten Gruppe kommt es ebenfalls bis zum 10. Tag zu einem Anstieg auf das 1,5-fache des Ausgangswertes. Ab dann fällt der Anteil der CD 2 positiven Zellen jedoch mit zwischen dem 18. und 32. Tag signifikant niedrigeren

Werten als in der unbehandelten HTX Gruppe. Verschiedene experimentelle Studien konnten zeigen, dass eine Blockade des CD 2 Rezeptors die Überlebenszeit von Herz-Allotransplantaten signifikant verlängert [44, 45].

4.3.2 EXPRESSION VON CD 3 REZEPTOREN

CD 3 Rezeptoren gehören ebenfalls der Immunglobulinsuperfamilie an. Sie werden auf reifen T-Zellen exprimiert und sind mit dem Antigenrezeptor von T-Zellen (TCR) assoziiert. CD 3 stellt ein Komplex aus drei verschiedenen Proteinen, CD 3 γ , CD 3 δ und CD 3 ϵ , dar. Der sogenannte CD 3-Komplex ist mit dem T-Zell-Rezeptor an der Zelloberfläche stabil verbunden.

Der von uns verwendete CD 3 markierende Antikörper stammte von der Firma Pharmingen. Es handelte sich um einen FITC markierten Maus-anti-Ratte Antikörper des Isotyps Maus IgG₃, κ (Klon G4.18) [46].

Anti-CD 3 mAb werden seit einigen Jahren in der Transplantationsmedizin eingesetzt, um Transplantatüberleben zu verlängern [47, 48], sowie zur Therapie der akuten Transplantatabstoßung [49, 50].

Während der 60 Tage unserer Untersuchung, bewegt sich der Anteil CD3 exprimierender Zellen in der unbehandelten Gruppe konstant zwischen 65% und 85%. Größere Schwankungen sind hier nicht zu erkennen. Der Verlauf in der Cyclosporin A behandelten Gruppe erscheint im Gegensatz dazu insgesamt inhomogener. Fast während des gesamten zeitlichen Verlaufs ist der Anteil CD3 positiver Zellen in der behandelten Gruppe niedriger, zum Teil mit $p = 0.0011$ auch hoch signifikant niedriger. Diese Beobachtung steht somit im

Einklang zu Untersuchungen, die einen Effekt in der Induktion von Immuntoleranz nach der Gabe von monoklonalen Anti-CD3 Antikörpern beschreiben [51, 52].

4.3.3 DIE EXPRESSION VON CD 4 REZEPTOREN

Der zeitliche Verlauf der CD 4 exprimierenden Zellen im myocardialen Gewebe unterscheidet sich in der behandelten sowie in der unbehandelten Gruppe deutlich voneinander.

Das CD 4 Antigen markiert T-Helferzellen und inflammatorische T-Zellen sowie Monozyten und Macrophagen [53,54]. Das CD 4 Antigen mit einem Molekulargewicht von 55 kd bildet in seiner Funktion ein Corezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle. Der von uns verwendete Antikörper stammt von der Firma Biosource. Es handelte sich um einen FITC markierten Maus-anti-Ratte Antikörper des Isotyps Maus IgG1 (Klon W3/25) [55, 56]. Er bindet Ick an der cytoplasmatischen Seite der Membran.

Wie die FACS-Analyse deutlich zeigt, kommt es während des Beobachtungszeitraums zu einer deutlichen Diskrepanz der Antigen Expression. Dabei steigt der CD 4 Anteil post transplantationem in der unbehandelten Gruppe kontinuierlich an. Ein Maximum der T-Helfer vermittelten Abstoßung ist am Tag 22 erkennbar. Hiervon unterscheidet sich deutlich der Verlauf der CSA behandelten Gruppe. Nach einem initial hohen Anteil CD 4 positiver Zellen kommt es bereits in den ersten Behandlungstagen zu einem signifikanten Rückgang der T-Helfer ($p = 0,0002$), der bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes persistiert.

Hier gemachte Beobachtungen sind mit Ergebnissen anderer Untersuchungen vergleichbar, wo z.B. durch Verwendung CD 4 freier Versuchstiere ein Allotransplantatüberleben induziert wurden konnte [57,58,59].

4.3.4 DIE EXPRESSION VON CD 5 REZEPTOREN

Der monoklonale Maus-Anti-Ratte-Antikörper vom Typ IgG₁,κ, OX-19 bindet primär an T-Lymphozyten [60,61]. Der Verlauf CD 5 positiver T-Lymphozyten im Untersuchungszeitraum liegt im Durchschnitt um 10 %. Einen deutlich unterschiedlichen Verlauf erkennt man während des 10. und 30. Tag post transplantationem. Hier sind in der unbehandelten Gruppe T-Lymphozyten Anteile von bis zu 29 % erkennbar. Ein signifikanter Unterschied besteht am 26. Tag ($p = 0,00833$). Diese T-Zell-Antwort entspricht der typischen primären Transplantatabstoßung bei MHC-Inkompatibilität [62,63]. Unter Cyclosporin A läuft diese Reaktion deutlich milder ab.

4.3.5 DIE EXPRESSION VON CD 8 REZEPTOREN

Der Antikörper MRC OX-8 markiert Suppressor- und Zytotoxische-T-Zellen. Der CD 8 markierende Antikörper stammte von der Firma Biosource. Es handelte sich um einen FITC gekoppelten Maus-anti-Ratte Antikörper des Isotyps IgG₁ (Klon MRC OX-8).

Ein Charakteristikum der akut myokardialen Abstoßung des menschlichen Herzens ist der Anstieg CD8 positiver, Zytotoxischer-T-Zellen [64, 65]. Wir finden in den ersten 20 Tagen einen deutlichen Anstieg von Zytotoxischen-T-Zellen im transplantierten Myokard. Unter Cyclosporin A Behandlung kommt es initial ebenfalls zu einem Anstieg CD8 exprimierender T-Zellen bis zum 12.Tag. Von hier an fällt ihr Anteil und persistiert bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes auf einem Niveau zwischen 10% und 35% [66, 67]. Die am

48. Tag explantierten Herzen fallen mit einem deutlich höheren Anteil aus der Reihe. Ein Anstieg in dieser späten Phase des Transplantatüberlebens erscheint schwer zu interpretieren und ist in dieser Form bislang nicht beschrieben. Eine geplante, genauere Untersuchung dieses Zeitraumes mit einem engerem Zeitraster kann hier Klarheit bringen.

4.3.6 DIE EXPRESSION VON CD 11A REZEPTOREN

Das CD 11a-Antigen, auch als LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) bezeichnet, ist die α^L -Untereinheit des Integrins LFA-1 (assoziiert mit CD18) und bindet an ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3. LFA-1 wird auf allen T-Zellen exprimiert und stellt ein wichtiges Adhäsionsmolekül für die Lymphozytenaktivierung dar [68,69,70]. Es handelte sich um einen FITC gekoppelten Maus-anti-Ratte Antikörper des Isotyps IgG_{2a}, κ (Klon WT.1). In experimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Blockade von LFA-1 in Kombination mit einer Blockade von VLA-4 (CD 49d) das Transplantatüberleben deutlich verlängern kann. Eine alleinige Blockade von LFA-1 führt jedoch nicht zu einer signifikanten Verlängerung des Transplantatüberlebens [71]. In unserer Untersuchung konnten wir zeigen, dass der Anteil CD 11a exprimierender Zellen, im Fall der mit Cyclosporin A behandelten Gruppe, gegenüber der unbehandelten Gruppe im Beobachtungszeitraum abnimmt; dies insbesondere gegen Ende des Untersuchungszeitraumes ($p = 0.020$ am 48. Tag). Auch hier scheint ein Zusammenhang zwischen der Rolle des Rezeptors bei der subakuten Abstoßung und seiner verminderten Expression unter CSA Therapie zu bestehen.

4.3.7 DIE EXPRESSION VON CD 11B REZEPTOREN

Der als CD 11b (MAC-1) bezeichnete Rezeptor ist eine α^M -Untereinheit des Integrins CR3 (assoziiert mit CD18) und bindet CD54 (ICAM 1) extrazelluläre Matrixmoleküle sowie die Komplementkomponenten iC3b. Der von uns verwendete Clon MRC OX-42 bindet an den CD 11b Rezeptor myeloider Zellen wie aktivierter Macrophagen oder Granulozyten [72,73,74].

Von Bedeutung ist der Rezeptor bei der Diapedese myeloider Zellen durch Endothel.

Da die Transplantatabstoßung primär T-Zell vermittelt ist [75,76], erscheint die Kontinuität im Expressionsverlauf des Antigens nachvollziehbar. Während des Beobachtungszeitraums kommt es in der unbehandelten Gruppe nur zu geringen Schwankungen um einen Wert von 75%. In der mit Cyclosporin A behandelten Gruppe erfolgt ein kontinuierlicher, signifikanter Abfall ($p < 0,05$ an den Tagen 40-60) der Expression des CD 11b Rezeptors.

4.3.8 DIE EXPRESSION VON CD 18 REZEPTOREN

Da CD 18 die β_2 -Untereinheit der Integrine darstellt und an CD 11a und CD 11b bindet, ist ein ähnlicher zeitlicher Verlauf wie bei den oben erwähnten Rezeptoren zu erwarten.

Der von uns eingesetzte Antikörper [77,78] des Clons WT.3 ist ein Maus anti Ratte Antikörper (IgG₁, κ).

Tatsächlich zeigt der Verlauf der CD 18 Expression eine deutliche Ähnlichkeit zu dem Verlauf von CD 11a- und CD 11b-Antigenen [79, 80]. Ebenso erkennt man eine deutliche geringere Expression in der CSA behandelten Gruppe (26. und 32. Tag, 48. und 56.Tag $p < 0.05$).

4.3.9 DIE EXPRESSION VON CD 25 REZEPTOREN

Mit CD 25 oder auch Tac (T-cell activation antigen) wird die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors bezeichnet. Sie ist als einzige der drei, den Il-2-Rezeptor aufbauenden Kette, spezifisch. Das CD 25- Molekül besteht nur aus einer kurzen zytoplasmatischen Sequenz, durch die keine direkte Signaltransduktion in die Zelle möglich ist. Die α -Kette hat ein Molekulargewicht von 55 kDa und wird von verschiedenen Zellen erst nach deren Aktivierung exprimiert. Die β -Kette (CD 122) ist auch an der Bildung des Il-15-Rezeptors beteiligt. Sie spielt eine Rolle bei der Signaltransduktion, ohne jedoch selbst Enzymaktivität zu besitzen.

Die γ -Kette (CD 132) ist selbst nicht an der direkten Bindung zum Il-2-Molekül beteiligt, besitzt aber ebenfalls eine wichtige Funktion für die Signaltransduktion. Mutationen in dem Gen für diese 64 kDa schwere Kette führen zu einem schweren, kombinierten Immundefekt (SCID), da diese Kette an der Bildung mehrerer anderer Interleukin-Rezeptoren beteiligt ist (Il-4, Il-7, Il-9, Il-13). Die β - und γ -Kette bilden zusammen den Il-2-Rezeptor mit mittlerer Affinität, das heißt, sie binden Il-2 mit einer Bindungskonstante (K_d) von 10^{-9} mol/l. Das bedeutet, dass relativ hohe Il-2-Konzentrationen zu einer Aktivierung der Zellen nötig sind. Beide Untereinheiten werden zusammen auf ruhenden T-, B- und NK-Zellen exprimiert. Die α - Kette assoziiert mit der β -, γ -Untereinheit zum hochaffinen Il-2-Rezeptor ($K_d = 10^{-11}$ mol/l); hier reichen schon geringe Il-2-Konzentrationen aus , um ein Wachstumssignal auszulösen. Die α -Kette allein hat nur eine Bindungskonstante von 10^{-8} mol/l. Experimente mit Zellen, die nur die α - Untereinheit exprimieren, zeigen, dass die Bindung von Il-2 hier zu keiner messbaren biologischen Antwort führt [81, 82].

Bei dem von uns eingesetzten Antikörper handelt es sich um einen Maus-anti-Ratte Antikörper vom Isotyp IgG₁ des Clons MRC OX-39. Der Antikörper bindet an die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors [83,84].

In unserer Untersuchung kommt es bis zum 10. Tag zu einem Anstieg von 65 % (Tag 2) auf am 78 % (Tag 10) CD 25 exprimierender Zellen in der unbehandelten Gruppe. Anschließend wird, nach einem vorübergehenden Abfall am 14. Tag, bis zum Ende des

Untersuchungszeitraumes ein Anteil von ca. 70 % ohne große Schwankungen gehalten.

In der behandelten Gruppe fällt, ausgehend von einem Ausgangswert von 60, 5 % (Tag 2) ein initial rapider Abfall bis zum 14. Tag auf einen Anteil von 13 % auf. Einem anschließenden Anstieg auf ein Niveau unterhalb des Ausgangswertes folgt ein erneuter Abfall bis zum Ende des Untersuchungszeitraums.

Betrachtet man den Wirkungsmechanismus der Substanz Cyclosporin A (siehe 4.1.), erscheint der zeitliche Verlauf beider Gruppen verständlich, da Cyclosporin A die IL-2-Freisetzung aus T-Helferzellen und indirekt die IL-1-Freisetzung aus Makrophagen [22,23] verhindert; in höheren Konzentrationen wird auch die Expression des IL-2-Rezeptors unterdrückt [24]. Daraus resultieren signifikante Unterschiede an den Tagen 10- 22 ($p < 0,05$) sowie ab dem 48. Tag ($p < 0.005$) bis zum Ende des Untersuchungszeitraums.

In den letzten Jahren konnten Antikörper isoliert werden, die an Untereinheiten des IL-2-Rezeptors binden und diesen blockieren. Therapeutische Erfolge in klinischen Studien führten unlängst zur Einführung der Substanz Basiliximab (Simultect®), einem chimärisierten monoklonalen Antikörper, der spezifisch gegen die α -Kette des IL-2-Rezeptors gerichtet ist [85,86,87,88]. Zugelassen wurde der Antikörper zur Prophylaxe der akuten Abstoßungsreaktion bei nierentransplantierten Patienten.

4.3.10 DIE EXPRESSION VON CD 45RA REZEPTOREN

Bei dem Antigen CD 45RA handelt es sich um die Isoform des LCA (leucocyte common antigen) CD 45 mit einem Molekulargewicht von 220 kd. Ihrer Funktion nach erhöhen diese Tyrosinphosphatasen die Signalvermittlung über den Antigenrezeptor von B- und T-Zellen

[89,90,91]. Der Rezeptor wird auf B-Zellen, Untergruppen von T-Zellen (naive T-Zellen) und Monozyten exprimiert.

Wir verwendeten zur Erkennung der CD 45RA Rezeptoren einen Maus-Anti-Ratte-Antikörper des Isotyps IgG₁ des Klons MRC OX-33 [92]. Wie verschiedene Untersuchungen zeigen konnten, kann mit der Blockierung von B-Zellen durch Anti-CD-45RA-Antikörper die Proliferationsantwort von B-Zellen auf einen adäquaten Reiz deutlich reduziert werden [93].

In unserer Untersuchung nimmt zu Beginn des Untersuchungszeitraumes die Anzahl von CD 45RA positiven Zellen sowohl in der unbehandelten wie auch in der behandelten Gruppe zu. Dabei ist der Anstieg in der unbehandelten Gruppe (von ca. 40 % auf bis über 60 %) ausgeprägter als in der mit Cyclosporin A behandelten Gruppe. Auch kommt es in der CSA behandelten Gruppe schon am 6. Tag zu einem deutlichen Abfall, der mit unter 20 % am Tag 18 weniger als die Hälfte des Ausgangswertes ausmacht.

Signifikante Unterschiede sind insbesondere in dem Zeitraum vom 18. Tag ($p < 0,01$) bis zum 32. Tag ($p < 0,001$) zu erkennen. Da die Antikörper vermittelte, humorale Abstoßung in der Diskussion um das chronische Transplantatversagen einen wichtigen Raum einnimmt, kann ein hier erkennbarer Anstieg eines auf B-Zellen exprimierten Antigens diese Theorie unterstützen.

4.3.11 DIE EXPRESSION VON CD 49D REZEPTOREN

Das auch als VLA-4 (very late antigen) bezeichnete Antigen CD 49d gehört zur Gruppe der α -Integrine. Die Bezeichnung VLA resultiert aus der Tatsache, dass die Expression dieser Integrine erst in der späten Phase der T-Zell-Aktivierung deutlich ansteigt. Dabei nimmt VLA-4 eine wichtige Rolle in der Steuerung der aktivierten T-Zelle in ihr Zielgebiet ein.

Das α^4 -Integrin CD 49d bindet unter anderem VCAM-1. Exprimiert wird VLA-4 auf Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen [94,95].

Bei dem von uns verwendeten Antikörper handelt es sich um ein Maus-anti-Ratte-Antikörper des Isotyps IgG_{2a}, κ . Die Bezeichnung des Klons ist MR α 4-1. MR α 4-1 reagiert mit der α_4 Untereinheit des $\alpha_4\beta_1$ -Integrins, das auf peripheren T- und B-Lymphozyten, Thymozyten, Mastzellen und Monozyten exprimiert wird [96,97].

Gleich zu Beginn des Untersuchungszeitraumes kommt es in der unbehandelten Gruppe, als Ausdruck der Mobilisation immunkompetenter Zellen, zu einem steilen Anstieg CD 49d positiver Zellen auf mehr als das sechsfache von Tag 2 (10%) bis Tag 26 (63,5%). Diese Beobachtung scheint um so interessanter, als daß in unserem Transplantationsmodell eine akute Abstoßung gar nicht stattfindet [17]. Sollte diese Reaktion also Ausdruck einer chronischen Abstoßung sein, dann könnte auch der verzögerte Anstieg von CD 49d exprimierenden Zellen in der Cyclosporin A behandelten Gruppe Ausdruck einer chronisch ablaufenden Immunreaktion, zumindest aber mitverantwortlich, für eine Transplantatvaskulopathie sein.

Überraschend ist das hohe Ausgangsniveau in der behandelten Gruppe (49 % am 2. Tag). Als einzige Erklärung bleibt hier eine mögliche Reaktion auf das Medikament zu Beginn der Applikation, die ähnlich ist, wie die initiale Ausschwemmung von Leukozyten, die man bei einer Corticosteroidtheapie beobachten kann.

4.3.12 DIE EXPRESSION VON CD 71 REZEPTOREN

Der Transferrinrezeptor CD 71 wird auf allen stark proliferierenden Zellen exprimiert. Diese vermehrte Zellteilung kann sich dabei sowohl auf hämopoetische Zellen beziehen als auch einfach auf mesenchymale Zellen.

Der von uns eingesetzte Maus-anti-Ratte-Antikörper des Isotyps IgG_{2a}, mit der Klon

Bezeichnung MRC OX-26 bindet an den Transferrinrezeptor CD 71 der Ratte [98,99].

Die Verläufe von Zellen aus transplantiertem myokardialen Gewebe unterscheiden sich, unabhängig davon ob CSA behandelt oder nicht, kaum. In beiden Gruppen sistiert der Anteil CD 71 exprimierender Zellen vom Beginn der Untersuchung bis zum 48. Tag um 70%. Ab dem 55. Tag fällt dieser Anteil in der behandelten Gruppe schlagartig auf unter 20%, während der Anteil in der unbehandelten Gruppe unverändert bleibt.

4.4 Hypothese

Das von uns verwandte Transplantationsmodell ist für die Ausbildung einer chronischen Abstoßung im Sinne einer Transplantatvaskulopathie etabliert [17]. Mit unserer Untersuchung versuchen wir einen Hinweis darauf zu erhalten, welcher Genese die, bei der Transplantatvaskulopathie zu beobachtende konzentrische Intimaproliferation, ist. Mehrere anerkannte Modelle versuchen eine Antwort auf diese Frage zu liefern.

Eine Theorie geht von der Annahme aus, dass die Transplantatvaskulopathie eine chronische humorale Abstoßung ist, bei der zytotoxische Antikörper entweder gegen MHC Klasse I oder II- Antigene gerichtet sind, die eine Komplementfixierung oder eine antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität bewirken [100].

Eine andere Theorie besagt, dass die Ursache der Transplantatvaskulopathie eine durch zytotoxische T-Zellen vermittelte Endothelialitis ist [101].

Darüber hinaus wird vermutet, dass die Transplantatvaskulopathie eine lokalisierte chronisch Zell-vermittelte Immunantwort analog der „delayed type hypersensitivity“ ist. Sie beinhaltet die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren nach komplexen Interaktionen zwischen den Endothelzellen des Spenderorgans und den mononukleären Zellen des Empfängers, die in einer Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen in der Intima der Koronargefäße resultiert [102, 103].

In einer vierten Theorie wird unterstellt, dass die Veränderung der chronischen Abstoßung zahlreiche Gemeinsamkeiten mit anderen entzündlichen Prozessen aufweist. Die Gefäßveränderungen werden hierbei als Folge wiederholter Endothelverletzungen mit konsekutiver Intimaproliferation und –hypertrophie angesehen, das heißt als teilweise Antigen-unabhängiger Prozeß [104, 105]. Die initiale Endothelschädigung wird durch Ischämie, Konservierung und Perfusion hervorgerufen, die durch zirkulierende Antikörper, Antigen-Antikörper-Komplexe und Komplement verstärkt wird. Hieraus resultiert eine vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle, eine Kollagenexposition und eine Thrombozytenakkumulation. Die verletzten Endothelzellen setzen zahlreiche Mediatoren frei, welche in Verbindung mit den vermehrt exprimierten Adhäsionsmolekülen die zelluläre Infiltration durch Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten fördern [106]. Die aktivierten infiltrierenden Zellen wiederum setzen weitere Faktoren (Zytokine und Wachstumsfaktoren) frei, welche die myointimale Proliferation wiederum verstärken.

In unserer Untersuchung konnten wir zeigen, dass verschiedene Leukozytensubpopulationen in unterschiedlicher Ausprägung und in unterschiedlichem zeitlichen Verlauf im myokardialen Gewebe transplanterter Rattenherzen auftreten. Wir haben dazu eine Methode etabliert, die in diesem Zusammenhang bisher noch keinen Einsatz gefunden hat; nämlich die

Homogenisierung des myokardialen Gewebes und die anschließende Detektion bestimmter Oberflächenantigene, um damit eine Aussage über die infiltrierenden immunkompetenten Zellen machen zu können.

Besonders auffällige Verläufe finden wir bei der Expression von LFA-2, CD 4, CD 8 und CD 49 d. Dabei handelt es sich in allen Fällen um Antigene, die auf T-Zellen exprimiert werden. Diese Beobachtung würde die Theorie von Hruban et al. unterstützen, die in der Transplantatvaskulopathie eine durch zytotoxische T-Zellen vermittelte, Endothelialitis sieht [101]. Hierbei scheint besonders VLA-4, mit seinem Anstieg in der unbehandelten Gruppe vom 2. bis zum 30. Tag und dem Anstieg in der behandelten Gruppe zwischen dem 18. und 40. Tag, eine mögliche Rolle als Marker zuzukommen. Die Applikation eines Anti-CD 49d-Antikörpers in Kombination mit einem Anti-LFA-1-Antikörper konnte das Langzeitüberleben in einer Gruppe Inselzell-transplantierter Ratten signifikant verlängern [107]. T-Helfer-Zellen (CD 4) werden bei nahezu allen inflammatorischen Reaktionen vermehrt exprimiert. Auch bei unserer Untersuchung konnte eine deutlich vermehrte Expression nachgewiesen werden, jedoch kommt es in der immunsupprimierten Gruppe nicht, wie bei VLA-4, zu einem erneuten Anstieg [108].

Auch diese Beobachtungen sprechen für eine entzündliche Genese der Transplantatvaskulopathie. Hier können weitere Untersuchungen, bei denen zu der Immunsuppression mit Cyclosporin A mit Anti-CD 49d- Antikörpern behandelt wird, zeigen, ob eine myointimale Proliferation reduziert werden kann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die in der Zwischenzeit erreichten guten Erfolge bei der Herztransplantation in Bezug auf die operative und früh postoperative Letalität werden durch die nach wie vor recht ungünstige Langzeitüberlebensrate relativiert. Als Ursache für das „chronische Transplantatversagen“ konnte die Transplantatvaskulopathie ausgemacht werden. Ihr morphologisches Korrelat ist eine konzentrische Intimaproliferation, die im Gegensatz zur Arteriosklerose häufig diffus auftritt und auch distal die kleinsten Koronararterien betrifft. Die Ursache dieser häufig zum Organverlust führenden, Veränderung der Koronargefäße ist nach wie vor nicht vollständig geklärt. Eine Theorie geht von einer chronischen, von zytotoxischen T-Zellen vermittelten Endothelialitis aus.

In unserer Untersuchung, die ein Tiermodell verwendet, in dem es nicht zu einer akuten sondern nur zu einer chronischen Organabstoßung kommt, konnten verschiedene T-Lymphozyten assoziierte Rezeptoren in ihrem zeitlichen Verlauf nachgewiesen werden. LFA-2, CD 4, CD8 und CD 49d fallen durch einen Anstieg in der frühen Phase post transplantationem besonders auf. Durch eine Immunsuppression mit Cyclosporin A wird dieser initiale Anstieg deutlich gemindert. VLA-4 (CD 49d) wird ebenfalls in den ersten 20 Tagen unter Immunsuppression signifikant weniger exprimiert; Dann allerdings kommt es zu einem Anstieg auf das Niveau der unbehandelten Gruppe. Eine durch VLA-4 vermittelte Immunreaktion könnte als Kofaktor einer die konzentrische Intimaproliferation unterhaltende Endothelialitis angesehen werden. Hier sehen wir einen Ansatz für weitere Studien.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 BARNARD CN: The Operation. S. Afr. Med. J.;1967: 41; 1271

- 2 MARTIN S, DYER PA: The case for matching MHC genes in Human organ transplantation. Nat. Genet.; 1993: 5; 210-3

- 3 OPELZ G, WUJCIAK T: The influence of HLA compatibility on graft survival after heart transplantation. The collaborative study. N. Engl. J. Med.; 1994: 330; 816-9

- 4 JOHNSON FL.: Heart transplantation. An update and review. Minerva Cardioangiol. 2003: 51(2); 245-55

- 5 KRIETT JM, KAYE MP: The registry of the international society for heart transplantation: seventh official report 1990. J. Heart Lung Transplant.; 1990: 9; 323-30

- 6 URETSKY BF, MURALI S, REDDY PS, RABIN B, LEE A, GRIFFITH BP, HARDESTY RL, TRENTA A, BAHNSON HT: Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy cyclosporine and prednisolone. Circulation; 1987: 76; 827-34

- 7 VAN DEN BROEK SAJ, VAN VELDHUISEN DJ, DE GRAEFF PA, CRIJNS HJGM, VAN GILST WH, HILLEGE H, LIE KI: Mode of death in patients with congestive heart failure: comparison between possible candidates for heart transplantation and patients with less advanced disease. J. Heart Lung Transpl.; 1993: 12; 376-71

- 8 KOSEK JC, HURLEY EJ, LOWER RR: Histopathology of orthotopic canine cardiac homograft. Lab. Invest.; 1968: 19; 97-112

- 9 KOSEK JC, CHATRAN C, HURLEY EJ, LOWER RR: Arteries in canine cardiac homografts: ultrastructure during acute rejection. Lab. Invest. 1969: 21; 328-35

- 10 BERNHART GR, PASCOE EA, MILLS AS, SZENTPETERY S, EICH DM, MOHANAKUMAR T, HASTILLO A, THOMPSON JA, HESS ML, LOWER RR: Accelerated coronary arteriosclerosis in cardiac transplant recipients. Transpl. Rev.; 1987: 1; 31-46

- 11 STARNES V, STINSON EB, OYER PE, VALANTINE H, BALDWIN JC, HUNT SA, SHUMWAY NE: Cardiac transplantation in children and adolescents. Circulation; 1987: 76 (Suppl. V); V43-7

- 12 BILLINGHAM ME: Graft coronary disease: The lesions and the patients. Transpl. Proc.: 1989: 21; 3665-6

- 13 THOMSON JG: Production of sever atheroma in atransplanted human heart. Lancet ii; 1969:1088

- 14 BIEBER CP, STINSON EB, SHUMWAY NE, PAYNE R, KOSEK J: Cardiac transplantation in man. VII. Cardiac allograft pathology. Circulation; 1970: 41; 753-72

- 15 BILINGHAM ME: Cardiac transplant arteriosclerosis. Transpl. Proc. 1987: 19 (suppl. 5); 19-25

- 16 KOSEK JC, BIEBER CP, LOWER RR: Heart graft arteriosclerosis. Transpl. Proc.; 1971: 3; 512

- 17 ADAMS DH, TILNEY NL, COLLINS JJ, KARNOVSKY MJ.: Experimental Graft Ateriosklerosis. The Lewis-to-Fisher allograft model. Transplantation; 1992: 53; 1115-9

- 18 ONO K, LINDSEY ES.: Improved technique of heart transplantation in rats. J. Thoracic Surgery; 1969: 547; 225

- 19 SCHMID C, BINDER J, HEEMANN U, TILNEY NL: Successful heterotopic heart transplantation in the rat. Microsurgery; 1994: 15; 279-81

- 20 RÜEGGER A, KUHN M, LICHTI H, LOOSLI HR.: Cyclosporin A, a peptide metabolite from *Trichoderma polysporum*, with a remarkable immunosuppressive activity; *Helv. Chim. Acta*; 1976:59; 1075-92

- 21 NEYE H.: Biochemie der Immunsuppressiva. Arzneimitteltherapie; 1998: 3; 82-90

- 22 ELLIOT JF, LIN Y, MIZEL SB, BLEACKLEY RC.: Induction of interleukin 2 messengers RNA inhibited by cyclosporin A. Science; 1984: 226; 1439-41

- 23 KRONKE M, LEONARD WJ, DEPPER JM, ARYA SK, ET AL.: Cyclosporin A inhibits T cell groth factor gene expression at the level of nRNA transction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 1984: 81; 5214-8

- 24 HEROLD KC, LANCKI DW, MOLDWIN RL, FITCH FW.: Immunosuppressive effects of cyclosporin A on cloned T cells. *J. Immunol.*; 1986: 136; 1315-21

- 25 SGROSSO JL, FERRER J, ARAUJO G, ROMEO L, PARISI C, VAZQUEZ MC.: Histopathological findings in heart transplant patients under tacrolimus-mycophenolate mofetil versus cyclosporine microemulsion-azathioprine. *Transplant Proc.*; 2002; 34(1): 115-6

- 26 HESS AD, TUTSCHKA PJ.: Effect of Cyclosporin A on cloned T cells. *J. Immunol.*; 1988:124; 2601-8

- 27 HANDSCHUMACHER RE, HARDING MW, RICE J, DRUGGE RH.: Cyclophilin: Aspecific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*; 1984: 236; 544-7

- 28 BRAM RJ, HUNG DT, MARTIN PK, SCHEIBER SL, ET AL.: Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK 506: roles of calcineurin and cellular location. *Mol. Cell. Biol.*;1993: 13; 4760-9

- 29 CLIPSTONE NA, CRABTREE GR.: Calcineurin is akey signaling enzyme in T lymphocyte activation and target of the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK 506. *J. Biol. Chem.*; 1993: 696; 20-30

- 30 TEEBKEN OE, STRUBER M, HARRINGER W, PICHLMAIER MA, HAVERICH A.: Primary immunosuppression with tacrolimus and mycophenolate mofetil versus cyclosporine and azathioprine in heart transplant recipients. *Transplant Proc.*; 2002: 34(4); 1265-8

- 31 KHANNA A, LI B, STENZEL KH, SUTHANTHIRAN M.: Regulation of new DNA synthesis in mammalian cells by cyclosporin. Demonstration of a transforming groth factor beta-dependent mechanism of inhibition of cell growth. *Transplantation*; 1994: 57; 577-82

- 32 SIEKIERKA JJ, HUNG SH, POE M, LIN CS, ET AL.: A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK 506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature*; 1989: 341; 755-7

- 33 HARDING MW, GALAT A, UEHLING DE, SCHREIBER SL.: A receptor for the immunosuppressant FK 506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature*; 1989: 341; 758-60

- 34 HARRISON RK, STEIN RL.: Substrate specificities of the peptidy-prolyl-cis-trans isomerase activities of cyclophilin and FK 506 binding protein. *Biochemistry*; 1990: 29; 3813-6

- 35 OHARA K, BILLINGTON R, JAMES RW, DEAN GA, ET AL.: Toxicologic evaluation of FK 506. *Transplant. Proc.*; 1990: 22; 83-6

- 36 KUMANO K, WANG G, ENDO T, KUWAO S.: FK 506-induced nephrotoxicity in rats. *Transplant. Proc.*; 1991: 23; 512-5

- 37 SCHWANINGER M, BLUME R, OETJEN E, KNEPEL W.: The immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK 506 inhibit calcineurin phosphatase activity and gene transcription mediated through the cAMP-responsive element in an nonimmune cell line. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*; 1993: 348; 541-5

- 38 JAIN J, LOH C, RAO A.: Transcriptional Regulation of the IL-2 Gene. *Curr. Opin. Immunol.*; 1995: 7; 333-42

- 39 MINAMI Y, KONO T, MIYAZAKI T, TANIGUCHI T.: The IL-2 receptor complex: Its structure, function and target genes. *Annu. Rev. Immunol.*; 1993: 11; 245-67

- 40 SEVENTER VAN GA, SIMUZI Y, SHAW S.: Roles of Multiple Accessory Molecules in T Cell Activation. *Curr. Opin. Immunol.*; 1991: 3; 294-303

- 41 WILLIAMS AF, BARCLAY AN, CLARK SJ, PATERSON DJ, WILLIS AC.: Similarities in sequences and cellular expression between rat CD 2 and CD 4 antigens. *J. Exp. Med.*; 1987; 165; 368-80

- 42 CLARK SJ, LAW DA, PATERSON DJ, PUKLAVEC M, WILLIAMS AF.: Activation of rat T lymphocytes by anti-CD monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.*; 1988: 167; 1861-72

- 43 LAFFERTY KJ.: A contemporary view of transplantation tolerance: An immunologist's perspective. *Clin. Transplant.*; 1994: 8; 181-7

- 44 SIDO B, DENGLER TJ, OTTO G, ZIMMERMANN R, MÜLLER P, MEUER SC.: Differential immunosuppressive activity of monoclonal CD 2 antibodies on allograft rejection versus specific antibody production. *Eur. J. Immunol.*; 1998: 28; 1347-57

- 45 CHAVIN ET AL.: Anti-CD 2 and Anti-CD 3 monoclonal antibodies synergize to prolong allograft survival with decreased side effects. *Transplantation*; 1993: 55; 4; 901-8

- 46 NICOLLS MR, AVERSA GA, PEARCE NW, SPINELLI A, BERGER MF, GURLEY KE, HALL BM.: Induktion of long term specific tolerance to allografts in vivo by therapy with a monoclonal antibody to rat CD3. Transplantation; 1993: 55; 459-468

- 47 KRASINSKAS AM, KREISEL D, ACKER MA, BAVARIA JE, POCHETTINO A, KOTLOFF RM, ARCASOY S, BLUMENTHAL N, KAMOUN M, MOORE JS, ROSENGARD BR.: CD3 monitoring of antithymocyte globulin therapy in thoracic organ transplantation. Transplantation; 2002: 73(8); 1339-41

- 48 VIGERAL P, CHOKOFF N, CHATENAUD L, ET AL.: Prophylactic use of OKT3 monoclonal antibody in cadaver kidney recipients. Transplantation; 1986: 41; 730

- 49 COSIMI AB, BURTON RC, COLVIN RB, ET AL.: Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. Transplantation; 1981: 32; 535

- 50 ORTHO MULTICENTER TRANSPLANT STUDY GROUP.: A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplant. N. Engl. J. Med.; 1985: 313; 337

- 51 WEETALL M, DIGAN ME, HUGO R, MATHEW S, HOPF C, TART-RISHER N, ZHANG J, SHI V, FU F, HAMMOND-MCKIBBEN D, WEST S, BRACK R, BRINKMANN V, BERGMANN R, NEVILLE D, LAKE P.: T-cell depletion and graft survival induced by anti-human CD3 immunotoxins in human CD3epsilon transgenic mice. Transplantation; 2002: 73(10); 58-66

- 52 KNECHTLE SJ, KIRK AD, FECHNER JH, HONG X, DONG Y, HAMAWY MM, HARLAN DM.: Inducing Unresponsiveness by the use of Anti-CD3 Immunotoxin, CTLA4-Ig, and Anti-CD40 Ligand. Transplantation Proceedings; 1999: 31 (Suppl B); 27S-28S

- 53 COSGROVE D, CHAN SH, WALZINGER C, BENOIST C, MATHIS D.: The thymic Compartment Responsible for positive selection of CD 4⁺ T cells. Int. Immunol; 1992: 4; 707-10

- 54 FOWLKES BJ, SCHWEIGHOFER E.: Positive selection of t cells. Curr. Opin. Immunol.; 1995: 7; 188-95

- 55 SZETO WY, KRASINSKAS AM, KREISEL D, KRUPNICK AS, POPMA SH, ROSENGARD BR.: Depletion of recipient CD4⁺ but not CD8⁺ T lymphocytes prevents the development of cardiac allograft vasculopathy. Transplantation; 2002; 73(7); 1116-22

- 56 WHITELAND JL, ET AL.: Cytochem.; 1995: 143; 313-20

- 57 KRIEGER NR, YIN DP, GARRISON-FATHMAN C.: CD 4⁺ cells but not CD 8⁺ cells are essential for allojection. J. Exp. Med.; 1996: 184(5); 2013-8

- 58 OROSZ CG, HUANG EH, BERGESE SD, SEDMAK DD, BIRMINGHAM DJ, OHYE RG, VANBUSKIRK AM.: Prevention of acute murine cardiac allograft rejection: anti-CD 4 or anti-vascular cell adhesion molecule one monoclonal antibodies block acute rejection but permit persistent graft-reactive alloimmunity and chronic tissue remodelling. J. Heart Lung Transplant.; 1997: 16; 889-904

- 59 VANBUSKIRK AM, WAKELEY ME, OROSZ CG.: Acute rejection of cardiac allografts by noncytolytic CD 4⁺ cell populations. Transplantation; 1996: 62; 300-2

- 60 KÜHNLEIN P, PARK HJ, HERRMANN T, ELBE A, HÜNIG T.: Identification and characterization of rat γ/δ T-lymphocytes in peripheral lymphoid organs, small intestine, and skin with a monoclonal antibody to a constant determinant of the γ/δ T cell receptor. J. Immunol.; 1994; 153; 979-86

- 61 DE BOER NK, AMMERLAAN WAM, MEEDENDORP B, KROESE FGM.: CD 5 B cells in the rat? Ann. N.Y. Acad. Sci.; 1992: 651; 157-9

- 62 LAFFERTY KJ.: A contemporary view of transplantation tolerance: an Immunologist's perspective. Clin Transplant.; 1994: 8; 181-7

- 63 SHI C, LEE WS, HE Q, ZHANG D, FLETCHER DL, NEWELL JB, HABER E.: Immunologic basis of transplant associated arteriosclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci.; 1996: 93; 4051-6

- 64 CREEMERS P; BRINK J; WAINWRIGHT H; MOORE K; SHEPHARD E; KAHN D.: Evaluation of peripheral blood CD4 and CD8 lymphocyte subsets, CD69 expression and histologic rejection grade as diagnostic markers for the presence of cardiac allograft rejection. Transpl. Immunol.; 2002: 10(4); 285-92

- 65 NORMANN SJ, SALOMON DR, LEELACHAIKUL P, KHAN SR, STAPLES ED, ALEXANDER JA, MAYFIELD WR, KNAUF DG, SADLER A, SELMAN S.: Acute vascular rejection of the coronary arteries in human heart transplantation: pathology and correlations with immunosuppression and cytomegalovirus infection. J. Heart Lung Transpl.; 1991: 10; 674-87

- 66 MCKEE CM; DEFINA R; HE H; HALEY KJ; STONE JR; PERKINS DL.: Prolonged allograft survival in TNF receptor 1-deficient recipients is due to immunoregulatory effects, not to inhibition of direct antigraft cytotoxicity. *J. Immunol.*; 2002: 168(1); 483-9

- 67 YANG J; JARAMILLO A; LIU W; OLACK B; YOSHIMURA Y; JOYCE S; KALEEM Z; MOHANAKUMAR T.: Chronic rejection of murine cardiac allografts discordant at the H13 minor histocompatibility antigen correlates with the generation of the H13-specific CD8+ cytotoxic T cells. *Transplantation*; 2003; 76(1): 84-91

- 68 HOGG N, LANDIS RC.: Adhesion molecules in cell Interactions. *Curr. Opin. Immunol.*; 1993: 5; 383-90

- 69 PICKER LJ.: Control of lymphocyte homing. *Curr. Opin. Immunol.*; 1994: 6; 394-406

- 70 DUSTIN ML, SPRINGER TA.: T cell receptor crosslinking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature.*; 1989: 341; 619-24

- 71 YANG H, ISSEKTZ TB, WRIGHT JR.: Prolongation of rat islet allograft survival by treatment with monoclonal antibodies against VLA-4 and LFA-1. *Tranplantation.*; 1995: 60; 71-6

- 72 WHITELAND JL ET AL: *J. Histochem. Cytochem.*; 1995: 43; 313-20

- 73 BARCLAY AN ET AL: *EMBO J.*; 1987: 6; 1259-64

- 74 ROBINSON AP, WHITE TM, MASON DW: *Immunology*; 1986: 57; 239-47

- 75 LAFERTY KJ: A contemporary view of transplatation tolerance: An Immunologist`s Perspective. *Clin. Transplant.*; 1994: 8; 181-7

- 76 HAYRY P ET AL: Chronic allograft rejection. *Immunol. Rev.*; 1993: 134; 33-81

- 77 TAMANATI T, KOTANI M, MIYASAKA M: Characterization of the rat leukocyte integrin, CD 11/ CD18, by the use of LFA-1 subunit-specific monoclonal antibobies. *Eur. J. Immunol.*; 1991: 21; 627-33

- 78 YAMAZAKI T, SEKO Y, TAMATANI T, MIYASAKA, YAGITA H, OKUMURATA K, NAGAI R, YAZAKI Y: Expression of intercellular adhesion molecule-1 in rat heart with ischemia/

reperfusion and limitation of infarct size by treatment with antibodies against cell adhesion molecules. *Am. J. Path.*; 1993: 143; 410-8

79 BOWDEN RA; DING ZM; DONNACHIE EM; PETERSEN TK; MICHAEL LH; BALLANTYNE CM; BURNS AR.: Role of alpha4 integrin and VCAM-1 in CD18-independent neutrophil migration across mouse cardiac endothelium. *Circ. Res.*; 2002: 90(5);562-9

80 KAWATA H, AOKI M, HICKEY PR, MAYER JE: Effect of antibody to leukocyte adhesion molecule CD 18 on recovery of neonatal lamb heart after 2 hours of cold ischemia. *Circulation*; 1992: 86 (suppl. II); 364-70

81 BAAN CC; BALK AH; VAN RIEMSDIJK IC; VANTRIMPONT PJ; MAAT AP; NIESTERS HG; ZONDERVAN PE; VAN GELDER T; WEIMAR W.: Anti-CD25 monoclonal antibody therapy affects the death signals of graft-infiltrating cells after clinical heart transplantation. *Transplantation*; 2003: 75(10); 1704-10

82 BREIDENBACH T, JOSEF C: Fortschritte in der Transplantationsimmunologie. *Innovartis*; 1998: 4; 5-14

83 WHITELAND JL ET AL: *J. of Histochem. Cytochem.*; 1995: 43; 313-20

84 FOSSUM ET AL: The OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily. *Eur. J. Immunol.*; 1991: 21; 671-9

85 YASUDA K, NEMOTO T, OHASHI Y, SATOMI S, MURATA K, ISHII N, TAKESHITA T, SUGAMURA K: Prolongation of allograft survival by administration of mAb specific for the three subunits of Il-2 receptor. *Int. Immunol.*; 1998: 10; 561-7

86 ONRUST SV, WISEMAN LR: Basiliximab. *Drugs*; 1999: 57; 207-13

87 CINCENTI F, KIRKMAN R, LIGHT S, BUMGARDNER G, PESCOVITZ M; HALLORAN P, NEYLAN J, WILKINSON A, EKKBERG H, GASTON R, BACKMAN L, BURDICK J: Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapie Study Group. *N.Eng. J. Med.*; 1998: 338; 161-5

88 WALDMANN TA, O'SHEA J: The use of antibodies against the Il-2-receptor in transplantation. *Curr. Opin. Immunol.*; 1998: 10; 507-12

- 89 MICHIE CA, MCLEAN A, ALCOCK C, BEVERLY PCL: Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD 45 isoforms. *Nature*; 1992: 360; 264f.

- 90 NOVAK TJ, FARBER D, LEITENBERG D, HONG S, JOHNSON P, BOTTOMLY K: Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect t-cell recognition. *Immunity*; 1994: 1; 81-92

- 91 MACKAY CR: Immunological Memory. *Adv. Immunol.*; 1993: 53: 217-65

- 92 BARCLAY A ET AL: *EMBO J.*; 1987: 6; 1259-64

- 93 MORIKAWA K, OSEKO F, MORIKAWA S: The role of CD 45RA on human B-cell function: anti-CD 45RA antibody (anti-2H4) inhibits the activation of resting B cells and antibody production of activated B cells independently in humans. *Scand. J. Immunol.*; 1991: 34 (3); 273-83

- 94 SHIMIZU Y, SEVENTER G VAN, HORGAN KJ, SHAW S: Roles of adhesion molecules in T-cell recognition: Fundamental similarities between four integrins on resting human t-cells (LFA-4, VLA-4, VLA-5, VLA-6)in expression, binding and costimulation. *Immunol. Rev.*; 1990: 114; 109-43

- 95 HAHN WC, ROSENSTEIN Y, CLAVO V, BURAKOFF SJ, BIENER B: A distinct cytoplasmic domain of CD 2 regulates ligant avidity and T-cell responsiveness to antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1992: 89; 7179-83

- 96 SPRINGER TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*; 1994: 76; 301-14

- 97 YASUDA M, HASUNUMA Y, ADACHI H, SEKINE C, SAKANISHI T, HASHIMOTO H, RA C, YAGITA H, OKUMURA K: Expression and function of fibronectin binding integrins on rat mast cells. *Int. Immunol.*; 1995: 7; 251-8

- 98 JEFFERIES WA, BRANDON MR, WILLIAMS AF, HUNT SV: *Immunology*; 1985: 54; 333-41

- 99 JEFFERIES WA, BRANDOM MR, HUNT SV, WILIAMS AF, GATTER KC, MASON DY: *Nature*; 1984: 312; 162-3

- 100 HESS JL, HASTILLO A, MOHANAKUMAR T, COWLEY MJ, VETROVAC G, SZENTPETERY S, WOLFGANG TC, LOWER RR: Accelerated atherosclerosis in cardiac transplantation: role of cytotoxic B-cell antibodies and hyperlipiemia. *Circulation*; 1983: 68 (suppl. 2); II94-101

- 101 HRUBAN RH, BESCHORNER WE, BAUMGARTNER WA: Accelerated arteriosclerosis in heart transplant recipients is associated with a T-lymphocyte-mediated endothelialitis. *Am. J. Pathol.*; 1990: 137; 871-82

- 102 LIBBI P, SALOMON RN, PAYNE DD, SCHOEN FJ, POBER JS: Funktions of vascular wall cells related to development of transplantation-associated coronary arteriosclerosis. *Transpl. Proc.*; 1989: 21; 3677-84

- 103 SALOMON RN, HUGHES CCW, SCHOEN FJ, PAYNE DD, POBER JS, LIBBY P: Human coronary transplantation-associated arteriosclerosis: evidence of a chronic immune reaction to activated graft endothelial cells. *Am. J. Pathol.*; 1991: 138; 791-8

- 104 TULLIUS SG, HEEMANN UW, TILNEY NL: Chronic rejection of rat kidney allografts can be reversed by retransplantation; ist later progression may be host independent. *Surg. Forum*; 1992: 43; 381-3

- 105 GREGORY CR, HUIE P, BILLINGHAM ME, MORRIS RE: Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. *Transplantation*; 1993: 55; 1409-18

- 106 TILNEY NL, WHITLEY WD, DIAMOND JR, KUPIEC-WEGLINSKI JW, ADAMS DH: Chronic rejection – an undefined conundrum. *Transplantation*; 1991: 52; 389-98

- 107 YANG H, ISSEKUTZ TB, WRIGHT JR: Prolongation of rat islet allograft survival by treatment with monoclonal antibodies against VLA-4 and LFA-1. *Transplantation*; 1995: 60; 71-6

- 108 ISSEKUTZ TB, WYKRETOWICZ A: Effect of a new monoclonal Antibody, TA-2, that inhibits Lymphocyte adherence to cytokine stimulated endothelium in the rat. *Transplantation*; 1991: 147; 109-16

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

CD	Cluster of differentiation
CsA	Cyclosporin A
EDTA	Ethylen diamin tetraacetic acid
FACS	Flourescence-activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FK-506	Tacrolimus
FL1	1. Fluoreszenz
FSC	Forward scatter
HLA	human leukocyte antigene
ICAM	intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
LCA	leukocyte common antigen
LFA	leucyte function-associated antigen
MHC	major histocompatibility complex
MMF	Mycophenolate Mofetil
PBS	Phosphat buffered saline
SSC	Sideward scatter
TCR	T-Zellrezeptor
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VLA	very late activation antigen
Längeneinheiten:	
nm	Nanometer
Masseneinheiten:	
mg	Milligramm

g Gramm

Hohlmaße:

μl Mikroliter

ml Milliliter

7.2. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. A. Moritz für die Überlassung des Themas und die Unterstützung meiner wissenschaftlich Tätigkeit danken.

Ganz außerordentlich möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Fieguth dafür danken, dass er durch sein wissenschaftliches Engagement und durch seinen verständnisvollen Beistand die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Herr Dr. med. M. Richter gebührt mein Dank für die Unterstützung in der Transplantationsphase. Sein Enthusiasmus hat den Umfang der Arbeit erst möglich gemacht.

Während der Arbeit im Transplantationsimmunologischen Labor habe ich besonders von der Erfahrung und der überlegenen Ruhe von Frau R. Schröder profitiert. Wichtige Ideen bei der Umsetzung unserer zu Beginn noch theoretischen Überlegungen stammen von Ihr.

Stets hilfsbereit und durch ihr freundliches Wesen ermunternd, stand mir auch Frau E. Oppermann zur Seite.

Meinem Freund und Kollegen Henning Jahr danke ich für die gute Zusammenarbeit. Mit ihm kam auch der dringend erforderliche Spaß in die wissenschaftliche Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich noch meiner Frau Eva und meinen Söhnen Ferdinand, Frederick und Benedikt für Ihr Verständnis danken, das sie aufbringen mussten, wenn Ihr Mann und Vater Nächte und Wochenenden bei den Ratten und im Labor verbracht hat. Meinen Eltern gebührt Dank für die subtile Motivation und für das Lektorat.

Jens D. Hahner

7.2. Lebenslauf

Name: Jens Dieter Hahner

Geburtsdatum: 09.02.1969

Geburtsort: Frankfurt am Main

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familiestand: verheiratet, drei Kinder

Schulbildung: 1975-1979 Grundschule Kronberg/ Oberhöchstadt
1979-1989 Altkönigsgymnasium
Kronberg im Taunus

Studium: WS 1989 Beginn des Studiums der Chemie an
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

SS 1990 Beginn des Studiums der Humanmedizin an
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

WS 1993 fachbereichsinterner Wechsel an
die Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

SS 1994 Ärztliche Vorprüfung

SS 1995 erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

SS 1997 zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

27.10.1997-28.09.1998 Praktisches Jahr im
St. Elisabethen Krankenhaus Frankfurt am Main

17. November 1998 drittes Staatsexamen und
Erteilung der vorläufigen Approbation

Ärztliche Tätigkeit:

1.1.1999-30.6.2000 Arzt im Praktikum an der
Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
Städt. Klinikum Fulda
Direktor: Prof. Dr. med. Th. J. Stegmann

1.7.2000-30.4.2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an
dem Zentrum für Anästhesie und Intensivmedizin des
Universitätsklinikums der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Direktor: Prof. Dr. med. R. Dudziak

Seit dem 1.5.2001 Assistenzarzt an der
Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie
Krankenhaus Nordwest, Frankfurt am Main
Direktor: Prof. Dr. med. H. Bockhorn

Zur Zeit Assistenzarzt in Rotation an der
Klinik für Unfall-, Wiederherstellungs- und
Wirbelsäulenchirurgie
Krankenhaus Nordwest, Frankfurt am Main
Direktor: PD Dr. med. A. Verheyden

Famulaturen:

1.3.1995-1.4.1995
Dr. med. N. Dörrler-Naidenoff
Praxis für Allgemeinmedizin
München

29.8.1995-24.9.1995
Abteilung für Chirurgie und Gefäßchirurgie
St. Franziskus Krankenhaus, Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. U. Stockmann

1.8.1996-30.9.1996
Abteilung für Kardiologie und
internistische Intensivmedizin
St. Markus Krankenhaus, Frankfurt am Main
Chefarzt: Dr. med. O. Ludwig

25.2.1997-25.3.1997
Klinik für Anästhesiologie und
operative Intensivmedizin
Universitätsklinikum Rudolf Virchow
Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. K. Falke

7.3. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Veränderung intramyokardialer Leukozytensubpopulationen nach Herztransplantation am Rattenmodell. Experimentelle Vergleichsstudie ohne Therapie versus immunsuppressiver Therapie mit Cyclosporin A.

im Zentrum der Chirurgie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, Abteilung für Thorax-, Herz- und thorakaler Gefäßchirurgie, Schwerpunkt Thoraxchirurgie und thorakale Transplantationschirurgie, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Fieguth und mit Unterstützung von Herrn Dr. med. M. Richter, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen, als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe in keiner anderen in – oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 4. März 2004

Jens D. Hahner